

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Struktur- und Funktionsanalyse der
humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3
(hUCP1, hUCP2 und hUCP3)**

von
Karina Frischmuth

aus
Peine

München
2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. M. Klingenberg betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 8.10.02

Karina Frischmuth

Dissertation eingereicht am 8.10.02

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Klingenberg

2. Gutachter: PD Dr. M. Meisterernst

Mündliche Prüfung am 27.02.03

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Physikalische Biochemie der Universität München (Abteilung Prof. M. Klingenberg) in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Klingenberg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Klingenberg möchte ich für die kompetente Begleitung und Unterstützung während der Anfertigung dieser Dissertation danken. Sein umfassendes Fachwissen, seine Anregung, seine Freude an der Arbeit und der mir gewährte Freiraum beeinflussten maßgeblich den erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation.

Die Vertretung dieser Dissertation gegenüber der chemischen Fakultät der Universität München wurde von PD Dr. M. Meisterernst übernommen, dem ich an dieser Stelle ganz herzlichst danke.

Für die hervorragende und freundschaftliche Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe, für die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen auch außerhalb des eigenen Fachgebiets möchte ich mich bei Karim Echtay, Andreas Schepermann, Shugui Huang, Hartmut Kaiser, Dörthe Druhmman, Sabine Odoj, Veronika Müller, Gaby Basset, Ilse Prinz, Hendrik Schubert, Hildegard Völz, Brigitte Nuscher und Prof. Dr. Beyer bedanken. Herzlich danken möchte ich Simone Heimpel und Martin Bienengräber für die sympathische Einführung in die molekularbiologischen Techniken.

Insbesondere gilt mein herzlicher Dank Edith Winkler für die unermüdliche Beantwortung meiner Fragen im Bereich Renaturierung, Rekonstitution und Messung.

Den Mitgliedern der Werkstatt Hans Berger, Heinz Kutschka, Alan Rusak und Hubert Nakel danke ich besonders für die immer prompte Behebung vieler technischer Probleme und die schnelle Hilfe bei allen Standortwechseln.

Schließlich danke ich meiner Familie für ihr Vertrauen in mein Können und ihre finanzielle Unterstützung, meiner Schwester Dr. Anja Frischmuth für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Dissertation und Dr. Hilkea Rosenbrock sowie Bernd Hauer für ihre ständige Motivation auf meinem Weg zu dieser Arbeit.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Echtay, K.S., Liu, Q., Caskey, T., Winkler, E., Frischmuth, K.; Bienengraber, M., Klingenberg, M. (1999) Regulation of UCP3 expressed by nucleotides is different from regulation of UCP1, FEBS Lett., 450, 8 – 12

Heidkaemper, D., Winkler, E., Muller, V., Frischmuth, K., Liu, Q., Caskey, T., Klingenberg, M. (2000) The bulk of UCP3 expressed in yeast cells is incompetent for a nucleotide regulated H⁺transport. FEBS Lett., 480, 265 – 270

Echtay, K., Winkler, E., Frischmuth, K., Klingenberg, M. (2001) Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁺transporters and highly nucleotide sensitive when activated by Coenzyme Q (Ubiquinone). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 1416 - 1421

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Regulation von UCP1	2
1.2. Vorkommen und Funktion von UCP2 und UCP3.....	3
1.3. UCP-Familie, Struktur und Funktion	6
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	8
 2. Material und Methoden	 10
2.1. Material	10
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	10
2.1.2. Antikörper.....	10
2.1.3. Reagenzien für die Molekularbiologie	11
2.1.4. Antibiotika für die Proteinexpression	11
2.1.5. Bakterien und Hefestämme.....	12
2.1.6. Plasmide.....	12
2.1.7. Medien.....	12
2.1.8. Geräte	13
2.2. Methoden	14
2.2.1. RT-PCR	14
2.2.2. Sequenzierung.....	16
2.2.3. Präparation von Plasmid-DNA	17
2.2.4. Reinigung von DNA.....	17
2.2.5. Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	17
2.2.6. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	18
2.2.7. Ligation von DNA.....	18
2.2.8. Gezielte Mutagenese	18
2.2.9. Herstellung kompetenter Zellen in <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	19
2.2.10. Herstellung kompetenter Zellen in <i>Escherichia coli</i>	19
2.2.11. Transformation in Hefezellen	20
2.2.12. Transformation in <i>E. coli</i> -Zellen.....	20
2.2.13. Proteinexpression	21
2.2.14. Isolierung von Mitochondrien	21
2.2.15. Membranpotentialmessungen an Mitochondrien.....	22

2.2.16.	Reinigung der Inclusion Bodies.....	22
2.2.17.	Renaturierung der Inclusion Bodies.....	23
2.2.18.	Rekonstitution von UCP in Phospholipidvesikeln.....	24
2.2.19.	Protonentransportmessung.....	25
2.2.20.	Berechnung des Protonentransportes	26
2.2.21.	Chloridtransportmessung.....	26
2.2.22.	Berechnung des Chloridtransportes	27
2.2.23.	Messung der Proteinbindung mit fluoreszierenden Nucleotid- Derivaten	28
2.2.24.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry und mit Amido Black.....	28
2.2.25.	Nachweis von UCP in den Mitochondrien	29
2.2.26.	Nachweis von Inclusion Bodies von <i>E. coli</i>	29
2.2.27.	SDS-Gelelektrophorese	30
2.2.28.	Immunoblot.....	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Expression der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.2	Wirkung der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 auf das Membran potential und die Atmung der Mitochondrien	36
3.2.1.	Beeinflussung des Membranpotentials von Hefemitochondrien durch hUCP1	37
3.2.2.	Membranpotential von Mitochondrien mit eingebautem hUCP2.....	39
3.2.3.	Einfluss des Membranpotentials auf Mitochondrien mit eingefügtem hUCP3	41
3.3.	Expression von hUCP in <i>E. coli</i>.....	43
3.3.1.	Expression von hUCP2 und hUCP3 in <i>E. coli</i>	44
3.3.2.	Expression von hUCP1 in <i>E. coli</i>	47
3.4.	Renaturierung und Rekonstitution der rekombinanten Uncoupling Proteine aus Inclusion Bodies von <i>E. coli</i>.....	49
3.5.	Bestimmung des H⁺-Transportes durch die humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3	52
3.6.	Ermittlung des Cl⁻-Transportes durch die humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3	58

3.7. Bindung von Dansyl-GTP und Dansyl-GDP an die humanen Uncoupling	
Proteine 1, 2 und 3.....	61
3.8. Mutagenese.....	63
3.8.1. Mutation des intrahelicalen Säurerestes D28 in hUCP3	66
3.8.2. Mutationen der Säurereste D164, E173 und D164+E173 in hUCP3.....	68
3.8.3. Mutationen der intrahelicalen Arginine R95, R188 und R282 in hUCP3.....	73
3.8.4. Mutation des Arginins R96 in hUCP2	76
4. Diskussion	79
4.1. Untersuchung der Funktion der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 an	
Mitochondrien von <i>S. cerevisiae</i>	79
4.1.1. Expression der humanen Uncoupling Proteine in <i>S. cerevisiae</i>	79
4.1.2. Fettsäureaktivierung und Purinnucleotidinhibierung der in Hefe exprimierten hUCPs	84
4.2. Expression, Renaturierung und Rekonstitution von hUCP1, 2 und 3	
in <i>E. coli</i>	86
4.2.1. Expression in <i>E. coli</i>	86
4.2.2. Optimierung der Renaturierung	88
4.2.3. Optimierung der Rekonstitution	90
4.3. Untersuchung der Transportfunktionen der humanen Uncoupling Proteine	
1, 2 und 3, exprimiert in <i>E. coli</i>.....	91
4.3.1. Protonentransport der Wildtyp-hUCPs	91
4.3.2. Anionentransport durch die Wildtyp-hUCPs.....	93
4.3.3. Bindungsverhalten der Wildtyp hUCPs	94
4.3.4. Mutagenese einzelner Aminosäuren in hUCP2 und hUCP3	94
4.3.4.1. D28N von hUCP3	95
4.3.4.2. D164N, E173Q und D164N+E173Q von hUCP3	96
4.3.4.3. R96T von hUCP2 und R95T, R188Q und R282Q von hUCP3.....	98
4.4. Physiologische Funktionen der humanen Uncoupling Proteine	101
5. Zusammenfassung	105
6. Abkürzungen	108
7. Literatur	110

1. Einleitung

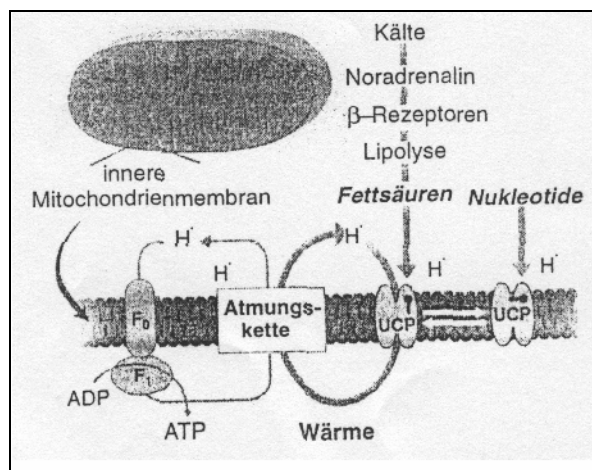
Die bisher bekannten Uncoupling Protein-(UCP)-Homologen bilden eine Subfamilie der mitochondrialen Carrier, die evolutiv miteinander verwandt sind und möglicherweise vom selben Protonen- und Anionentransportvorfahren abstammen. Vor 1995 war nur das Uncoupling Protein 1 aus braunem Fettgewebe (BAT) bekannt und man glaubte, dass UCP1 zu einem späteren Zeitpunkt der Evolution für die Thermogenese von Neugeborenen, Winterschläfern und Nagetieren entstanden war (Klingenberg, 1990). Vercesi entdeckte 1995 das nächste UCP (PUMP) in Pflanzen, und zwar in der Kartoffelknolle, und deutete diesen Befund so, dass das Stammgen von UCP sich wahrscheinlich in früheren Zeiten in Metazoen und Pflanzenarten unterteilte. Es folgte die Entdeckung weiterer Uncoupling Proteine wie die UCP-Varianten höherer Tiere UCP2 (Fleury et al., 1997; Gimeno; 1997), UCP3 (Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997) UCP4 (Sanchis et al., 1998) und BMCP (Mao et al., 1999) sowie verschiedene UCPs in Hefe (Jarmuszkiewicz et al., 2000), in Protozoen (Jarmuszkiewicz et al., 1999), in Mycetozoen (Jarmuszkiewicz, unveröffentlicht), in Fischen (Stuart et al., 1999) und in Vögeln (Raimbault et al., 2001). Nach Sluse et al. (2002) sind die UCPs multizellulär und wahrscheinlich während der Phylogenese vor dem Übergang in eine phänotypische Vielfalt der Eukaryonten entstanden und kommen in der gesamten eukaryontischen Welt vor.

Die Funktion, Regulation und Mechanismen der UCPs wurden bereits ausgiebig an UCP1 von verschiedenen Forschern untersucht und führten zur Annahme dass UCP1 aus BAT ein Beispiel für die anderen UCP-Isomeren ist. Kälteangepaßte, neugeborene oder Winterschlaf haltende Säugetiere besitzen BAT, das zur zitterfreien Wärmeerzeugung dient (Nicholls, 1974). Charakteristisch für die braunen Fettzellen ist ihr hoher Mitochondriengehalt, der den oxidativen Energievorrat der eukaryontischen Zellen darstellt. Isolierte Mitochondrien aus braunem Fettgewebe weisen eine hohe H^+ -Permeabilität auf (Smith et al., 1966). Es konnte gezeigt werden, dass dafür ein 33.2 kDa großes Protein aus der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist (Heaton et al., 1978; Nicholls, 1979), welches 1980 von Lin und Klingenberg isoliert und als Dimer vorliegend charakterisiert wurde. Der Transport von Elektronen über die mitochondriale Elektronentransportkette (Atmungskette) ist an den Protonenfluss aus den Mitochondrien ins Cytosol gekoppelt. Dadurch wird ein protonenelektrochemisches Potential aufgebaut. In allen Mitochondrien außer denen des braunen Fettgewebes wird die Energie in dem protonenelektrochemischen Potential gespeichert und vorwiegend durch die Synthese von ATP abgefangen, wenn die H^+ -Ionen durch die mitochondriale Matrix

über den ATP-Synthetase-Komplex zurückfließen. In braunen Fettmitochondrien ermöglicht das Uncoupling Protein 1 den Protonenrückstrom in die Mitochondrienmatrix ohne Speicherung der frei werdenden Energie in Form einer chemischen Bindung. Die Funktion des UCP1 besteht somit im Kurzschließen des Protonenflusses, so dass oxidative Energie in Form von Wärme abgegeben wird. Deshalb bleiben in diesen Mitochondrien Atmung und oxidative Phosphorylierung überwiegend ungekoppelt. Somit führt die Aktivität dieses Proteins zu einer Änderung des Energieflusses, indem Wärme statt Energie gebildet wird. Die Entkopplung von UCP1 benötigt freie Fettsäuren, während durch die Zugabe von Purinnucleosiddi- und -triphosphaten die Atmung wieder gekoppelt wird. Mit anderen Worten heißt das, dass die Purinnucleosiddi- und -triphosphate als Inhibitoren und die Fettsäuren als Aktivatoren der Entkopplung dienen.

1.1. Regulation von UCP1

Die Aktivität des braunen Fettgewebes, in dem UCP1 ausschließlich vorkommt, wird durch den Hypothalamus kontrolliert, wobei Kälte oder auch bestimmte Diäten stimulierend wirken. Das Gewebe wird durch das sympathische Nervensystem innerviert. Bei dessen Aktivierung wird Noradrenalin freigesetzt, welches an die β 3-Adrenorezeptoren des braunen Fettgewebes bindet und eine Erhöhung der cAMP-Konzentration verursacht. Durch die daraus resultierende verstärkte Lipolyse erhöht sich die freie Fettsäurekonzentration. Zusätzlich wird die UCP-Transkription verstärkt (Abb. 1-1) (Himms-Hagen, 1989). Die für die Regulation der Transkription verantwortlichen Enhancer-Stellen im upstream-Bereich des UCP-Gens sind teilweise identifiziert (Ricquier und Bouillaud, 1997).



*Abbildung 1-1
Schema der Funktion und
Regulierung von UCP1*

Eine Beteiligung des humanen UCP1 an der Regulierung des Körpergewichts wird seit längerer Zeit diskutiert. Im Zusammenhang damit könnte eine polymorphe Stelle im humanen UCP1-Gen interessant sein, die eine BclI-Restriktionsstelle auslöscht. Diese allelische Form ist in über 25 % der humanen UCP1-Gene enthalten (Oppert et al., 1994). Zwischen diesem Polymorphismus des UCP1-Gens und der Neigung kein Gewicht während einer hypokalorienhaltigen Diät zu verlieren, wurde eine Korrelation gefunden (Fumeron et al., 1996). Vermutlich ist das UCP1-Gen nicht das hauptsächliche Fettsucht-Gen, sondern bewirkt mit anderen Genen zusammen die Fettakkumulation (Clement et al., 1996). Die Forschergruppe um Ricquier (Gonzalez-Barroso et al., 2000) stellte bei der transkriptionellen Aktivierung des menschlichen UCP1-Promotors durch zyklisches AMP eine strikte Abhängigkeit von der Gegenwart von Retinoidsäure fest, was im Gegensatz zum UCP1-Gen von Nagetieren steht.

Die Arbeitsgruppe Kopecky (Baumruk et al., 1999) beschäftigte sich mit weißen Fettzellen, die durch mitochondriale Entkopplung der Fettbildung entgegenwirken könnten und dadurch Fettsucht verhindern. Im Zusammenhang mit der Fettsuchtresistenz wurde bei aP2-UCP1-transgenen Mäuse (Transgene Mäuse, bei welchen die Synthese von UCP1 über den Fettzellen Lipid-Bindungsprotein-Promotor gesteuert wird.), die ektopisches UCP1 in weißem Fett exprimieren (Kopecky et al., 1996) ein steigender Sauerstoffverbrauch in einigen Fragmenten des weißen Fettgewebes beobachtet. Auch die Stoffwechselgeschwindigkeit dieser Tiere stieg deutlich an. Von Baumruk et al. (1999) wurde des weiteren von einer Änderung des Membranpotentials durch UCP1 berichtet, das von weißen Fettzellen aus aP2-transgenen Mäusen in Mitochondrien isoliert wurde. UCP1 verminderte das Membranpotential bis zu dem Punkt, der für die entkoppelte Atmung erforderlich ist und bewirkte, dass das Membranpotential auch sensitiv gegenüber den regulierenden Liganden von UCP1 war. Dies könnte bedeuten, dass die mitochondriale Entkopplung in weißen Fettzellen die Entwicklung von Fettsucht verhindert.

1.2. Vorkommen und Funktion von UCP2 und UCP3

1997 wurden die Membranproteine UCP2 (Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997) und UCP3 (Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997) entdeckt mit einer Aminosäureidentität gegenüber UCP1 von 56 % und untereinander von 73 %. UCP2 ist weitverbreitet und mit hohen mRNA-Levels in Milz, Lunge und weißem Fettgewebe (WAT) präsent, mit mittlerer Expressionsstärke in Nieren, Hoden, Gebärmutter, BAT, Hirn und Herz sowie in geringem Ausmaß

in Skelettmuskel und Leber (Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997). Dabei kann die UCP2-mRNA in der Leber den Kupferzellen und nicht den parenchymalen Zellen zugeschrieben werden (Larrouy, et al., 1997). Dagegen ist das UCP3-Transkript nur im Fettgewebe und in Skelettmuskel vorhanden (Boss et al., 1997). UCP3 existiert in zwei Formen: Die lange Form (L) ist das Protein in seiner ganzen Länge sowie eine kurze Form, der ca. 30 Aminosäuren vom C-Terminus aus fehlen. In Bezug auf Primärstruktur, Größe und Molekulargewicht entsprechen hUCP2 und 3 der mitochondrialen Anionentransporterfamilie (Aquila et al., 1987). Auf Grund der Ähnlichkeit zwischen UCP1, 2 und 3 wird von einer allen drei zugrundeliegenden Protonentransportfunktion ausgegangen. UCP2 und 3 wurden entsprechend UCP1 in Hefe exprimiert und ein vermindertes Membranpotential wurde beobachtet (Fleury et al., 1997; Boss et al., 1997; Hinz et al., 1999; Hagen et al., 1999), was als mitochondriale Entkopplung der Atmung gewertet wurde. Durch Purinnucleotide wurde das Membranpotential bei UCP2 und 3 nicht wieder erhöht und die Forscher meinten, dass sich die Regulation der mitochondrialen Entkopplung für UCP1, 2 und 3 unterschiedlich verhält.

Bei Verwendung von in vivo (ganzen Tieren) und in vitro (Zell)-Systemen wurde ein Einfluß verschiedener Hormone, Hormonagonisten und physiologischer Bedingungen auf die mRNA-Expression von UCP2 und UCP3 beobachtet (Fleury et al., 1999; Ricquier et al., 2000; Boss et al., 1998). Die UCP2-mRNA-Expression wurde durch Faktoren, die den Energiestoffwechsel betreffen wie Thyroid, Leptin oder Hungern, erhöht. Ähnliches wurde für die UCP3-mRNA-Expression notiert, die insbesondere durch Faktoren, welche die Fettmobilisierung und Oxidation beeinflussen, z. B. Hungern (Boss et al., 1998), Muskularbeit (Tsuboyama-Kasaoka et al., 1998) und β 3-Agonisten (Lanni et al., 1999), gesteigert wurde. Hierbei wurde keine Erhöhung der UCP3-Protein-Expression bestimmt. Die Steigerung der UCP3-mRNA-Expression durch Bedingungen wie Fasten oder Triiodthyroninbehandlung führte zu keiner Änderung der mitochondrialen Energiekopplung im Muskel, was durch $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ -NMR in vivo bewiesen wurde (Jucker et al., 2000). Dementsprechend konnten Matthias et al. (1999) und Cadenas et al. (1999) trotz Steigerung der UCP2-mRNA-Expression kein UCP2-Protein detektieren. Cadenas et al. (1999) bestimmten auch die Protonenflussgeschwindigkeit in Skelettmuskelmitochondrien von ausgehungerten Ratten und sahen bei Vergleich mit Kontrolltieren keine Veränderung der Leitfähigkeit in den Skelettmuskelmitochondrien durch UCP3, obwohl dessen mRNA-Gehalt in den ausgehungerten Tieren deutlich höher lag. Im Kontrast zu diesen Ergebnissen wurde in Skelettmuskelmitochondrien, isoliert aus UCP3-knockout Mäusen, eine erhöhte Kopplung detektiert, dargestellt durch eine Verminderung der Atmung (Vidal-Puig et al., 2000) sowie des Protonenflusses (Gong et al., 2000). Interessant ist auch,

dass Mitochondrien von Mäusen mit überexprimiertem UCP3 einen erhöhten Sauerstoffverbrauch haben (Clapham et al., 2000). Dagegen zeigten die knockout-Mäuse keine phänotypischen Veränderungen des Körpergewichts oder der Stoffwechselgeschwindigkeit an, während Mäuse mit überexprimiertem humanen UCP3 übernervös und dünner als die Wildtypen waren (Clapham et al., 2000). Hier wirkte sich der Entkopplungseffekt phänotypisch aus.

Eine genetische Studie, bei der Mikrosatelliten in Menschen angewandt wurden, zeigte, dass die chromosomale Region, welche das UCP2- und UCP3 Gen enthält, mit der basalen Stoffwechselgeschwindigkeit verbunden ist (Voehringer et al., 2000). Dies unterstützt die Hypothese, dass die UCP-Gene relevant für die Regulation der Stoffwechselgeschwindigkeit sind und möglicherweise thermogenetisch wirken. In UCP1-knockout-Mäusen wurde keine Kälte- oder Diät-induzierte Thermogenese beobachtet und demnach kann davon ausgegangen werden, dass UCP2 und UCP3 keine UCP1-entsprechende physiologische Rolle bei der Wärmebildung haben (Nedergaard et al., 2001). Auf der anderen Seite wurde bei Ratten, nach einer fetthaltigen Diät, eine Korrelation zwischen der Resistenz Fettsucht zu entwickeln und der Induktion von UCP3 von Skelettmuskelmitochondrien beobachtet (Weigle et al., 2000).

Eine weitere interessante Entdeckung war, dass in transgenen Mäusen mit überexprimiertem UCP3 im Skelettmuskel eine gesteigerte Insulin-Sensitivität registriert wurde (Clapham et al., 2000). Eine Überexpression von GLUT4 in Mäusen verursachte eine erhöhte UCP3-Aktivität im Skelettmuskel (Tsuboyama-Kasaoka et al., 1999). Es gab auch eine positive Korrelation zwischen der UCP3-Expression und der Insulin initiiierenden Glucoseverwertung bei Diabetis-Patienten (Krook et al., 1998). Demnach könnte UCP3 die Insulin-Sensitivität verbessern und die Stimulierung der UCP3-Aktivität zu einer Korrektur der Insulin-Resistenz beitragen.

Kürzlich konnten Echtay et al. (2002) eine Aktivierung von UCP1, 2 und 3 aus Rattengewebe-mitochondrien durch Superoxid feststellen und vermuteten, dass dies einen Mechanismus für die Verminderung der Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der Mitochondrien darstellt. Eine milde Entkopplung vermindert die mitochondriale Produktion an ROS, die oxidative Schäden anrichten können (Papa et al., 1997; Brand et al., 2000). Durch eine Kälte-induzierte Produktion von ROS könnte das Vorkommen von UCP2 und UCP3 in Ectothermen (Stuart et al., 2001) und die Assoziation zwischen UCP2 und Zellen des Immunsystems in Säugetieren (Arsenijevic et al., 2000; Pecqueur et al., 2001) erklärt werden. Möglicherweise ist dies der Grund dafür, dass UCP2-knockout Mäuse gegenüber einer Infektion durch Endoparasiten resistent sind (Arsenijevic et al., 2000)

1.3. UCP-Familie, Struktur und Funktion

Als Mitglieder der 1987 postulierten Familie der mitochondrialen Carrier wurden als erstes der ADP/ATP-Carrier (Aquila et al., 1985), das Uncoupling Protein des braunen Fettgewebes (Aquila et al., 1985), der Phosphatcarrier (Runswick et al., 1987) und der Ketoglutarat/ Malat-Carrier (Runswick et al., 1990) identifiziert. Sie gehören zu einer Familie von Transportern, die als Transportsysteme für Ionen und Metaboliten durch die innere Mitochondrienmembran fungieren. Die mitochondrialen Carrier weisen einige strukturelle Gemeinsamkeiten auf: Sie sind meist etwa 300 Aminosäuren lang und besitzen ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa.

Dabei stellt das Uncoupling Protein ein Dimer mit zwei identischen Untereinheiten dar (Klingenberg, 1989; Lin et al., 1980). Jede der Untereinheiten besteht aus sechs hydrophilen Helices, welche die innere mitochondriale Membran durchspannen, wobei die C- und N-Termini in den Intermembranraum hineinragen (Klingenberg und Appel, 1988; Miroux et al., 1993). Ein Strukturmodell von haUCP1 ist in der Abbildung 1-2 dargestellt.

Die AS-Sequenz teilt sich in drei ähnliche Domänen auf: Drei Repeats beinhalten ca. 100 Reste mit zwei transmembranen Helices. Diese zwei Helices werden durch ca.

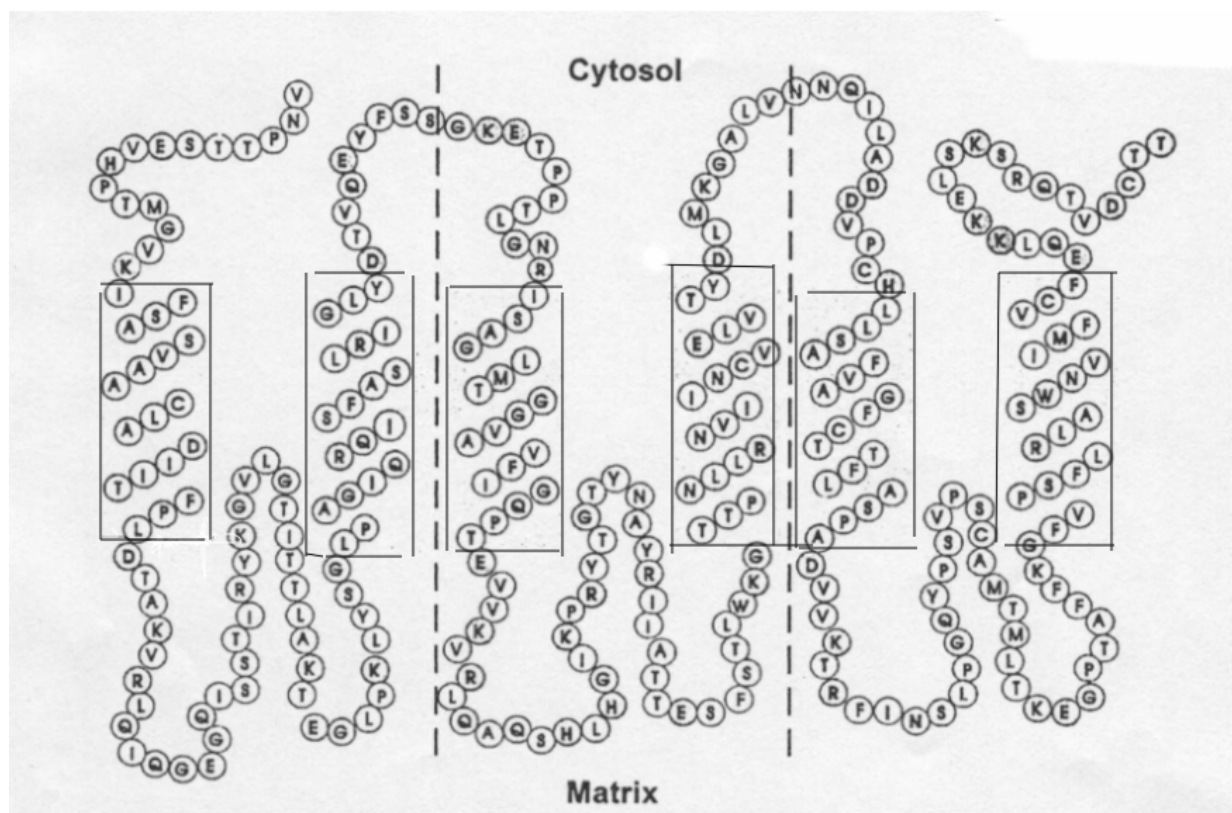


Abbildung 1-2

Sekundärstrukturmodell von Hamster-UCP1 nach Klingenberg (1999)

40 AS-lange, sehr hydrophile Sequenzen getrennt, die zur Matrixseite lokalisiert sind. In diesen Schleifen gibt es jeweils pro Domäne das Motiv PAXX+X+ (Palmieri, 1994), das charakteristisch für die mitochondriale Carrierfamilie einschließlich hUCP1, 2 und 3 ist. Des weiteren bilden ca. 18 AS innerhalb der 40 AS-langen Schleifen eine zusätzliche Schleife, die in die Membran hineinreicht (Winkler und Klingenberg, 1992).

Die AS-Schleifen auf der Matrixseite stellen wichtige Regionen für die Translokationswege dar und sind wahrscheinlich in den H^+ -Transfer verwickelt, während die zum Cytosol liegende Sektion eine wässrige Pore ausbildet (Klingenberg, 1999). Durch UCP können sowohl Protonen als auch Anionen (Cl^- , Br^- , I^- , Alkylsulfonate; Jezek und Garlid, 1990) transportiert werden und beide Transportwege können durch Purinnucleotide allosterisch inhibiert werden. Die Purinnucleotide binden von der cytosolischen Seite der mitochondrialen inneren Membran mit nur einem Molekül pro Dimer (Lin et al., 1982).

Als Cofaktoren für den H^+ -Transport dienen freie Fettsäuren, die sich in erhöhten Konzentrationen in BAT-Mitochondrien befinden (Klingenberg, 1994) sowie Ubiquinon (CoQ_{10}) (Echtay et al., 2000). Beide sind essentiell für den Protonentransport und führen zur Steigerung der Transportaktivität. Die Rolle der Fettsäuren beim Protonentransport wird kontrovers diskutiert. Rial et al. (1983) schlugen eine regulierende Bindungsstelle für Fettsäuren vor. Bei anderen Modellen sind die Fettsäuren direkt am H^+ -Transport beteiligt. Nach dem Modell von Klingenberg übernehmen die Fettsäuren gemeinsam mit funktionellen Gruppen des Proteins die Rollen von Protonenakzeptoren und -donoren im Translokationsweg für H^+ -Ionen (Abb. 1-3).

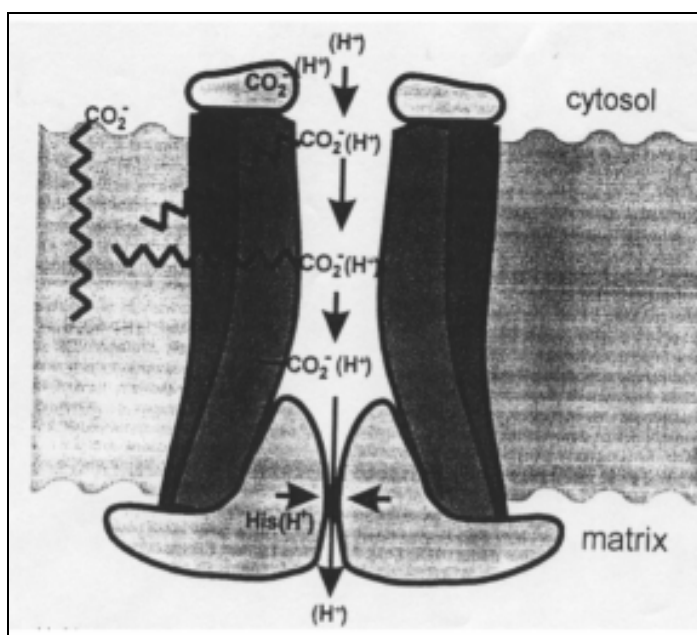


Abbildung 1-3

Ein Modell von Klingenberg und Echtay et al. (2000) für den Mechanismus des H^+ -Transportes durch UCP1 und die Rolle der Fettsäuren. Die Fettsäure tritt von der Lipidphase aus mit seiner Carboxylgruppe in den H^+ -Translokationsweg ein und fungiert dort als H^+ -Donor-Akzeptor zwischen den dort liegenden Carboxylgruppen von UCP1. Klingenberg et al. (2000) schlagen vor, dass der H^+ -Transportweg aus einer breiten wässrigen Pore und anschließend einem engen Kanal durch die Loops auf der Matrixseite besteht. Durch die Nucleotidbindung wird der enge Kanal geschlossen und der H^+ -Transport inhibiert.

Die Fettsäuren sorgen demnach für eine ausreichende Protonenkonzentration im Bereich des H^+ -Kanals (Winkler und Klingenberg, 1994). Skulachev (1991, 1998) schlug vor, dass Fettsäuren als Anionen von UCP1 transportiert werden. Danach würden die Fettsäuren in der protonierten Form durch die Mitochondrienmembran zurückdiffundieren, wodurch sich insgesamt ein H^+ -Transport ergeben würde. Arbeiten von Jezek und Garlid unterstützen die Hypothese von Skulachev (Garlid et al., 1996; Jezek et al., 1997).

Bei der Nucleotidbindung, die zur Inhibierung des Protonentransportes durch UCP führt, konnte eine starke pH-Abhängigkeit nachgewiesen werden (Klingenberg, 1988; Huang und Klingenberg, 1995). Die Bindungsaffinität von Purinnucleosiddi- und -triphosphaten an UCP1 sinkt mit steigendem pH-Wert, insbesondere die der Nucleosidtriphosphate. Vermutlich wird die Bindung von Purinnucleotiden durch die Deprotonierung eines sauren Restes (E190 von UCP1) und eines Histidins (H214 von UCP1) geschwächt, während die Deprotonierung der endständigen Phosphatgruppe der Nucleotide die elektrostatische Wechselwirkung mit dem Protein erhöht. Huang und Klingenberg (1996) zeigten, dass UCP1 Nucleotide in einer lockeren, nicht inhibierten Konformation und einer festen, inhibierten Konformation binden kann.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Als Zielsetzung dieser Arbeit sollten die neuentdeckten humanen Uncoupling Proteine 2 und 3 samt hUCP1 im Hinblick auf ihre Funktion und Struktur unter Berücksichtigung des schon seit längerem erforschten UCP1-Proteins aus Hamster untersucht werden. HaUCP1 war bereits erfolgreich in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert worden. An UCP1-enthaltenden Mitochondrien aus Hefe als auch an isoliertem, in Liposomen rekonstituiertem UCP1-Protein konnte der Protonen- und Anionentransport durch UCP1 sowie seine Nucleotidbindung gemessen werden (Bienengräber et al., 1998, Echay et al., 1997; 2000; 2001). Dementsprechend sollte das Expressionssystem der Hefe auf UCP2 und UCP3 übertragen werden, um mögliche gemeinsame oder unterschiedliche Transportfunktionen der neuen UCPs festzustellen. Eine Expression in Hefe gegenüber *E. coli* hat den Vorteil, dass das Protein sich in nativer Form in die Mitochondrienmembran einbaut und keine Renaturierung des Proteins notwendig ist. Zur Bestimmung der Protonenleitfähigkeit und seiner Nucleotidinhibierung wurde die Änderung des Membranpotentials an isolierten Hefemitochondrien mit eingebautem UCP ermittelt. Die Nucleotidbindung stellt das spezifische Merkmal für die UCP-Aktivität dar.

Als weiteres Ziel sollten die humanen Uncoupling Proteine in *Escherichia coli* exprimiert, renaturiert und in Liposomen rekonstituiert werden, um den Protonen- und Anionentransport sowie die Nucleotidinhibierung an isoliertem Protein direkt bestimmen zu können sowie einen Vergleich zu den Ergebnissen der in *S. cerevisiae* exprimierten UCPs herzustellen. Die Expression von UCP in *E. coli*-Zellen erfolgt nicht in Form eines löslichen Proteins, sondern in Form von Inclusion Bodies (Einschlusskörperchen, IB), wodurch UCP vor proteolytischem Abbau im Cytosol von *E. coli* geschützt ist. Der Nachteil der Bildung von IB liegt in der aggregierten, inaktiven Form des UCP-Proteins. Für die Renaturierung und Rekonstitution wurde auf die von Echtay et al. (2000) entwickelte Methode zurückgegriffen, die für die humanen Uncoupling Proteine weiter optimiert werden sollte. Für die Untersuchungen des Protonen- und Anionentransportes samt Nucleotidbindung in Proteoliposomen wurden Fluoreszenz-sensitive Messungen vorgenommen. Die Proteine sollten in ihren Funktionen auch untereinander verglichen werden.

Als letztes Ziel sollte zur Klärung der Transportmechanismen von UCP2 und insbesondere von UCP3 die Proteinstruktur durch gezielte Mutagenese näher untersucht und im Hinblick auf die bereits für UCP1 verfügbaren Daten verglichen werden. Dabei sollten Aminosäurereste, die eine Veränderung der Transport- oder Nucleotidbindungseigenschaften von UCP2 und 3 erzeugen, identifiziert werden. Durch gerichtete Mutagenese wurden verschiedene geladene Aminosäuren innerhalb der angenommenen Transmembranhelices – gemäß dem Strukturmodell für haUCP1- ersetzt. Für die Auswahl dieser Aminosäuren wurden die bereits für haUCP1 bekannten Strukturdaten herangezogen (Echtay et al., 2000, 2001) und zwar Aminosäuren, die bei haUCP1 am Transport und / oder an der Nucleotidbindung beteiligt sind. Jedoch muss die Mutation geladener Seitenketten mit besonderer Vorsicht im Hinblick auf die Faltung des Proteins interpretiert werden. Ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung, ob eine verminderte Transportaktivität des UCP nach Austausch einer Aminosäure auf deren direkter Beteiligung am Transport oder auf einer Strukturveränderung beruht, ist auch hier wiederum durch die Messung der Nucleotidbindung gegeben, die nur bei intakt gefaltetem Protein möglich sein sollte.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle gängigen organischen und anorganischen Substanzen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) oder BioMol (Hamburg) bezogen.

Die Substanzen für die Kulturmedien kamen von Difco Laboratories (Detroit, USA). Als Antiantikörper für den Immunoblot wurde der Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper von Sigma (Deisenhofen) eingesetzt.

Die nicht-ionischen Detergenzien Pentaethylenglycol-monodecyl-ether ($C_{10}E_5$) und Digitonin stammten von der Firma Fluka. Triton X-100 und N-Lauroyl Sarcosin Na-Salz (Sarcosyl) wurden von der Firma Sigma bezogen. Dowex 21K (20 x 50 mesh, Cl^- Form) der Firma Fluka, Sephadex G-75 von Pharmacia (Freiburg) und Amberlite XAD-2 (Bio beads, 20 x 60 mesh) von BioRad Laboratories (CA, USA) wurden verwendet.

Die Fluoreszenzfarbstoffe Pyranin (8-Hydroxypyranin-1,3,6-trisulfonsäure Na_3 -Salz) sowie mQAE [N-(ethoxy-carbonylmethyl)-6-methoxyquinoliniumbromid] und DISC₃ (3,3' Dipropylthiacarbocyaniniodid) wurden von Serva (Deutschland) und Molecular Probes (Leiden, Niederlande) eingesetzt. Das Dansyl-GTP bzw. -GDP ist nach einer Methode von Huang et al. (1994) hergestellt und aufgereinigt worden.

Phosphatidylcholin (PC) wurde aus Hühnereigelb isoliert und mit Alumina B Super I von ICN Biomedicals (Deutschland) nach einem von Klingenberg und Winkler (1985) beschriebenen Verfahren gereinigt.

Die Chemikalien für die Transportmessungen, Valinomycin, Laurinsäure und CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon) wurden von der Firma Sigma bezogen.

2.1.2. Antikörper

Tabelle-2.1

Die zum Nachweis der Uncoupling Proteine eingesetzten Antikörper

Bezeichnung	Art/ Sequenz	Nachweis	Hersteller
AK haUCP1	Proteinantikörper, polyklonal	haUCP1/hUCP1	AG Klingenberg
AK hUCP3 A	Peptidantikörper, polyklonal,	hUCP3	Fa. Merck
AK hUCP3 B	Peptidantikörper, polyklonal,	hUCP3/mUCP3	Fa. Merck

2.1.3. Reagenzien für die Molekularbiologie

Tabelle 2-1

Eingesetzte Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Reagenz	Verwendung	Firma
Midiprep-Kit	Extraktion von DNA	Quiagen, Hilden
Miniprep-Kit	Extraktion von DNA	Pharmacia, Freiburg
U.S.E. Mutagenese-Kit	Mutagenese	Pharmacia, Freiburg
Oligonucleotide, HPLC-ge-reinigt	Mutagenese, Sequenzierung	MWG-Biotech, Ebersberg Eurogentec, Seraing, Belgien
Radiolabeled terminator cycle sequencing kit	Sequenzierung	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK
ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung	PE Biosystems (Princeton, USA)
Restriktionsenzyme	Restriktion	New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus Roche, Mannheim
T4-Ligase	Ligation	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	PCR	Roche, Mannheim
DNA-Nucleotide	PCR	MBI, Fermentas
T4-Polynucleotidkinase	Phosphorylierung	MBI Fermentas
DNA-Standards	DNA-Konzentrationsbestimmung	Appligene, Heidelberg
Novozym	Enzymatische Verdauung der Hefezellwand	Novo Nordisk, Mainz
Zymolyase	Enzymatische Verdauung der Hefezellwand	Seikagaku Corp., Tokio, Japan

2.1.4. Antibiotika für die Proteinexpression

Tabelle 2-2

Verwendete Antibiotika für die Proteinexpression

Name	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml H ₂ O	150 µg/ml Medium
Chloramphenicol	34 mg/ml Ethanol	130 µg/ml Medium
Kanamycin	10 mg/ml H ₂ O	20 µg/ml Medium
Tetracyclin	5 mg/ml Ethanol	30 µg/ml Medium

2.1.5. Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 2-3

Eigenschaften der eingesetzten Bakterien- und Hefestämme

Genotyp	Stamm	Verwendung	Quelle/ Referenz
recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ⁺ proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] ^c	<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	Klonierung, DNA-Präparation	Bullock et al. (1987), Stratagene, Heidelberg
F ⁻ dcm ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B) gal λ(DE3)[plysS Cam ^r]	<i>Escherichia coli</i> BL21(λDE3)plysS	Expression der humanen UCPs	Hanahan, (1983)
Thi-1, supE, Δ(hsdSM mcrB), Δ(lac-proAB) [mutS.:Tn10] F ⁻ [proAB ⁺ lacIqZΔM15]	<i>Escherichia coli</i> NM522mutS	Mutagenese	U.S.E. Mutagenese Kit Pharmacia Biotech
MATα Ade2-1; His 3-11,15; Ura 3-52; can1-100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303D	Expression der hUCPs	Hörz, Universität München

2.1.6. Plasmide

Tabelle 2-4

Eigenschaften der eingesetzten Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Verwendung	Quelle/ Referenz
pGEM3Z	T7-P, SP6-P, lac-P, Amp ^r	Klonierung, Sequenzierung, Mutagenese	Promega (Heidelberg)
pT7 Blue	Amp, T7-P, lacZ	Klonierung, Mutagenese, Sequenzierung	Novagen; Clark (1988) Marchuk et al. (1991)
PET24a	Kan, T7-P, lacI, f1 origin, (T7-T)	Expression in <i>Escherichia coli</i>	Novagen; Studier et al. (1991)
pEMBLyex4	Gal/Cyc1-P, URA3, Leu2-2, Amp ^r	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	Cesareni und Murray (1987)

2.1.7. Medien

Für die Expression der UCPs in *S. cerevisiae* wurde ein spezieller Aminosäuremix* erstellt mit folgenden Bestandteilen pro Liter Anzucht:

40 mg Adenin, 25 mg L-Arginin, 32 mg L-Asparaginsäure, 16 mg L-Glutamin, 32 mg Glycin, 25 mg L-Histidin, 30 mg L-Leucin, 25 mg L-Methionin, 16 mg L-Prolin, 130 mg L-Threonin, 25 mg L-Tyrosin, 32 mg L-Alanin, 16 mg L-Asparagin, 16 mg L-Cystein-HCl, 32 mg L-Glutaminsäure, 25 mg Guanin, 30 mg L-Isoleucin, 40 mg L-Lysin, 32 mg L-Phenylalanin, 250 mg L-Serin, 25 mg Tryptophan und 65 mg L-Valin

Tabelle 2-5

Verwendete Medien für die Bakterien- und Hefezucht

Medium	Substanzen/ l H ₂ O	Verwendung	Referenz
LB	5 g Hefeextrakt, 10 g Bactotrypton, 10 g NaCl	Expression in <i>E. coli</i>	Sambroock et al. (1989)
SOC	5 g Hefeextrakt, 20 g Bactotrypton, 0.5 g NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose	Expression in <i>E. coli</i>	Sambroock et al. (1989)
2 x YT	16 g Bactotrypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl	Expression in <i>E. coli</i>	Sambroock et al. (1989)
Terrific Broth	12 g Bactotrypton, 24 g Hefeextrakt, 4ml Glycerol, 17 mM KH ₂ PO ₄ , 72 mM K ₂ HPO ₄	Expression in <i>E. coli</i>	Sambroock et al. (1989)
Minimal-medium	6.7 g Hefestickstoffbasis, 0.3 g Glucose, 1g KH ₂ PO ₄ , 1.2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 22ml Milchsäure, 1 g Aminosäuremix*	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	Difco Laboratories
YPD-Medium	6,7 g Hefestickstoffbasis, 20 g Dextrose, 20 g Bacto-Pepton,	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> auf Agarplatten	Sambroock et al. (1989)

2.1.8. Geräte

Tabelle 2-6

Benutzte Apparaturen

Gerätename	Einsatz	Firma
Progene-Thermocycler	PCR, Mutagenese	Fa. Techne, Cambridge Thermo-Dux, Wertheim
Elektrophoresekammern	DNA-Aufreinigung in Agarosegelen	Institutswerkstatt
Elektrophoresegerät	SDS-Gelelektrophorese, Immunoblot	Hoefer, Heidelberg
Double-beam Spectrometer UV-210A	Bestimmung der Proteinkonzentration	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
UV-Vis Scanning Spectrometer UV-2101PC	Bestimmung der DNA-Konzentration	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
Branson Sonifier B15 Branson Sonifier 250	Isolierung von Inclusion Bodies	Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Fluoreszenzspektro-MPF-44A-photometer	Transportkinetik- und Bindungsmessungen	Perkin Elmer
Fluoreszenzspektrometer	Membranpotentialmessung	Institutswerkstatt

2.2. Methoden

2.2.1. RT-PCR

Durch PCR wurden passende Schnittstellen in den UCP1, 2 und 3-cDNAs für den jeweiligen Expressionsvektor (für *E.coli* bzw. *S.cerevisiae*) erzeugt. Der Reaktionsansatz für die PCR wurde wie in Tabelle 2-7 zusammengestellt und erfolgte nach dem in Tabelle 2-8 aufgeführten Programm mit dem Thermocycler „Progene“.

Tabelle 2-7

Zusammensetzung der PCR

Reagenzien	PCR (100µl) Endkonzentrationen
Reaktionspuffer	1-fach
MgSO ₄	1,2 mM
D’NTPs	0,2 mM
5’-Primer	1 µM
3’-Primer	1 µM
Taq-Polymerase	1,2 µl
Plasmid-DNA	20-30 ng

Tabelle 2-8

PCR-Programm

Temperatur	Zeitdauer	Zyklen
95 °C	2 min	1
95 °C	30 sec	3
45 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
95 °C	30 sec	25
55 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
95 °C	30 sec	1
55 °C	30 sec	
72 °C	10 min	

Die Sequenzen der Primer für die Klonierung in die Expressionsvektoren für *S. cerevisiae* sind folgende:

hUCP1:

U1HforSac 5’ GTCAGAGGAGCTCATAATGGGGGGCCTGACAG 3’

U1HrevSal 5’ CCTTCTTGCTCGACTTATGTGGCACAGTCCATAG 3’

hUCP2:

U2HforSac 5' GCAGGAAGGAGCTCATAATGGTTGGGTTCAAGGC 3'

U2HrevBam 5' CAGCAGGGGATCCTCAGAAGGGAGCCTCTC 3'

hUCP3:

U3HforSac 5' GGAATTCGGAGCTCATAATGGTTGGACTGAAGCC 3'

U3HrevSal 5' CCTTCTTGCTCGACTCAAAACGGTGATTCCCG 3'

In den Forward-Primern wurden vor die Startsequenz ATG die 3 Basen ATA eingeführt, um die Expression in Hefe zu verbessern. Als Stopcodon wurde TGA oder TAA gewählt. Die Schnittstellen sind jeweils unterstrichen hervorgehoben.

Die DNA von hUCP1 enthielt in ihrer Sequenz eine NdeI-Schnittstelle, bei der ein stiller Basenaustausch durch gezielte Mutagenese (siehe Punkt 2.2.8.) vorgenommen wurde. Zur Klonierung der hUCP-DNAs in den *E. coli* Vektor pET 24a wurden die folgenden PCR-Primer verwendet:

hUCP1:

h1ndefor2 5' GGGCGAATTCGAGCATATGGGGGGCCTGACAG 3'

hUCP1preco 5' GCTTGCATGCCTGCAGGAAITCTTATGTGGCACAG 3'

hUCP2:

U2EcfornDe 5' GTAGCAGGAACCATATGATAATGGTTGGGTTCAAGG 3'

hUCP3:

U3EcfornDe 5' GCAGGAACCATATGGTTGGACTGAAGCCTTC 3'

Als Revers-Primer für hUCP2 und 3 wurden die Primer U2HrevBam und U3revSal wie für die Klonierung in den Hefevektor pEMBLyex4 benutzt.

Da die Expression von human UCP1 in *E.coli* sehr gering ausfiel, wurde die Startsequenz durch stillen Basenaustausch AT-reicher gemacht. Folgend Primersequenz wurde gewählt:

hUCP1pcrnde 5' TTCGATCATATGGGTGGTGGTCTAACAGCTTCAGACGTA
CACCCG 3'

Nach Durchführung der PCR wurden die DNA-Produkte aufgereinigt, einer Restriktionsverdauung unterworfen und anschließend in den entsprechenden Expressionsvektor kloniert. Die Ligationsansätze wurden in W303 *S. cerevisiae* Zellen bzw XL-1 blue *E. coli*-Zellen transformiert und davon wurden Kolonien zur Minipräparation und Sequenzierung ausgewählt.

2.2.2. Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde nach dem Protokoll des Sequenzierungskits von Amersham Life Science beruhend auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die Methode begründet sich auf der Verwendung von [$\alpha^{32}\text{P}$]-Dideoxynucleotiden (ddNTP) als Terminationsnucleotiden und der Thermosequense als DNA-Polymerase, die einen effizienten Einbau der radioaktiven Dideoxynucleotide garantiert.

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte in einem Ansatz von 20 μl mit ca. 500 ng Plasmid-DNA und 0,75 μM Sequenzierprimer nach Angabe des Herstellers. Die sich anschließende PCR-Reaktion wurde im Thermocycler in 25 Cyclen (95 °C: 30 sec, 55 °C: 30 sec, 72 °C: 80 sec) durchgeführt. Durch Zugabe einer Stopplösung (Formamid-haltig) wurden die Reaktionen beendet und die so erhaltenen radioaktiv markierten Abbruchfragmente in einem 6 % Acrylamidgel (Länge 45 cm) mit 8 M Urea in 1-fach TBE-Puffer aufgetrennt. Abhängig vom zu lesenden DNA-Bereich betrug die Laufzeit zwischen 1,5 und 3 h. Vor dem Giessen des Gels wurde eine der Glasplatten mit dem Antihafmittel Dichlormethylsilan behandelt und ließ sich daher nach Beendigung der Gelelektrophorese leicht vom Gel ablösen. Das auf der anderen Platte verbleibende Gel wurde in 10 % Methanol-, 10 % Essigsäure-Lösung fixiert und anschließend 1 h bei 80 °C getrocknet. Der Röntgenfilm wurde 24 h direkt auf dem Gel exponiert, danach entwickelt und ausgewertet.

Die durch gezielte Mutagenese (siehe Punkt 2.2.8.) veränderte UCP-cDNA wurde, beruhend auf der Dideoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977), mit dem Sequenzierkit von Perkin-Elmer (ABI Prism Big Dye Kit) analysiert. Der 10 μl Ansatz bestand aus 4 μl Reaction Mix, der die fluoreszierenden Dideoxynukleotide, den Puffer und die DNA-Polymerase beinhaltete, sowie 500 ng DNA und 3,2 pmol Primer. Nach Ablauf der 20 Cyclen im Thermocycler wurden die DNA-Sequenzprodukte einer Ethanol-fällung unterzogen und die verbleibenden DNA-Pellets von der Firma GATC gelelektrophoretisch aufgetrennt und dargestellt.

Die eingesetzten Primer lagen alle innerhalb der Gensequenzen, ausgenommen der T7-Primer.

T7 Primer	5' AATACGACTCAGTATAG 3' (alle UCPs)
Seq0	5' CCCAGGACACCTTTATACC 3' (hUCP1)
Seq1	5' CCCAATCTGATGAGAAGTG 3' (hUCP1)
Seq2	5' CAGATTTATTAATTCTCCACC 3' (hUCP1)
34DN	5' CACCTTCCCGCTGAACACAGCCAAAGTC 3' (hUCP1)

KFSU2-1	5' TCACACCGCGGTACTGGGCG 3' (hUCP2)
KFSU2-2	5' GTTACAGATCCAAGGAGAAAG 3' (hUCP2)
KFSU2-3	5' CACCAAGGGCTCTGAGCATG 3' (hUCP2)
KFSU2-4	5' CTCTGGAAAGGGACCTCTCC 3' (hUCP2)
KFSU2-5	5' GATACATGAACTCTGCCCTGG 3' (hUCP2)
KFSU2-16	5' CGATGCGGACAGAGGCAAAG 3' (hUCP2)
KFSU3-1	5' GCCCAGCACGCCACGGTACTG 3' (hUCP3)
KFSU3-2	5' CAGATCCAGGGGGAGAACCAG 3' (hUCP3)
KFSU3-3	5' CAAAGGCGCGGACAACTCCAG 3' (hUCP3)
KFSU3-4	5' GTCAGGGGCCTGTGGAAAGG 3' (hUCP3)
KFSU3-5	5' GCCACTTTGTCTCTGCCTTTG 3' (hUCP3)

2.2.3. Präparation von Plasmid-DNA

Die analytische Präparation von DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Dolly (1979) durchgeführt. Von den 1.5 ml Übernachtskulturen wurden die Zellen abzentrifugiert, in 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0 resuspendiert und durch Zugabe von 0.2 M NaOH, 1 % SDS bei 5 min 4 °C lysiert. Nach Fällung bakterieller Proteine und chromosomaler DNA mit 150 µl 3 M NaAc, pH 5.2 wurde der Überstand dreimal bei 16000 rpm abzentrifugiert und das Plasmid durch Ethanolfällung aufkonzentriert. Für die quantitative Präparation von DNA wurde der Qiagen Plasmid Kit nach dem als „plasmid midi preparation“ bezeichneten Verfahren verwendet.

2.2.4. Reinigung von DNA

Die PCR-Produkte und anderen DNA-Fragmente wurden über ein 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde durch Vergleich mit DNA-Längenstandards aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Qiaex II Gel Extraktions Kit nach Vorschrift des Herstellers eluiert. Durch Ethanolfällung erfolgte eine weitere Aufreinigung der DNA, die in einem geeigneten Volumen steriler 10 mM Tris/ HCl oder H₂O aufbewahrt wurde.

2.2.5. Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration von DNA im ng-Bereich wurde durch Vergleich mit einer Standard-DNA bekannter Konzentration erstellt, indem die Proben über ein Ethidiumbromid haltiges

Agarosegel aufgetrennt und mit den Fluoreszenzintensitäten definierter Banden des Standards ermittelt wurden. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA im μg -Bereich wurde die optische Dichte bei 260 nm (UV-2101PC) gemessen. Eine Konzentration von 50 μg /ml für doppelsträngige DNA entspricht einer OD_{260} von 1.

2.2.6. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Bei analytischen Restriktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers ca. 50 ng DNA in einem Volumen von 10 μl für 2 h geschnitten. Für präparative Restriktionen wurden 2-3 μg DNA in 50 μl mit ca. 20 U enzymatischer Aktivität über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wenn eine Restriktion mit verschiedenen Enzymen erforderlich war, die in unterschiedlichen Puffersystemen ihre optimale Aktivität zeigten, so erfolgte zwischen den verschiedenen Restriktionen eine Fällung der DNA durch Ethanol.

2.2.7. Ligation von DNA

Zum Klonieren der restriktionsverdauten und aufgereinigten DNA-Fragmente wurden Insert und Vektor in einem molaren Verhältnis von etwa 1:1 ligiert. Der auf Eis pipettierte 10 μl Ansatz wurde für 5 min in einem 45 °C Wasserbad inkubiert und danach sofort wieder in Eiswasser überführt, unter Zusatz von 1-2 U der T4-DNA-Ligase.

Die Ligation erfolgte über Nacht bei einem Temperaturgradienten von 16 °C nach 4 °C.

2.2.8. Gezielte Mutagenese

Die Mutationen wurden mit dem U.S.E.-Mutagenese-Kit von Pharmacia Biotech nach der Methode von Deng und Nickoloff, (1992) am doppelsträngigen Plasmid durchgeführt. Diese Methode (site-directed mutagenesis) basiert auf dem Einsatz eines phosphorylierten Mutationsprimers (siehe Tabelle 2-9) und eines ebenfalls phosphorylierten Selektionsprimers, der eine Restriktionsstelle (SspI) auf dem Plasmid eliminiert. Beide Oligonucleotide binden nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen Plasmid-DNA (pGEM3Z-UCP) an die gleiche Einzelstrang-Plasmid-DNA. Durch die Aktivität der T4-DNA-Polymerase wird von den beiden Primern ausgehend ein neuer Strang synthetisiert. Diese so mutierten Plasmide wurden im Anschluss mit dem Restriktionsenzym SspI behandelt, dessen Erkennungsstelle bei erfolgreicher Mutagenese durch den Selektionsprimer eliminiert sein sollte. Danach wurde dieser

Restriktionsansatz in den reparaturdefizienten *E. coli*-Zellstamm NM522mutS transformiert. Das Wildtyp-Plasmid lag wegen der Restriktionsverdauung linearisiert vor und wurde somit bei der Transformation nicht in die Zellen aufgenommen. Die Plasmid-DNA der Transformanten wurde per Minipräparation isoliert und zum zweiten Mal mit SspI behandelt. Die DNA wurde nun in die XL1-blue Zellen (*E. coli*) transformiert und einzelne Kolonien durch Plasmidisolierung und folgende Sequenzierung auf die gewünschte Mutation hin untersucht. Als Selektionsprimer wurde ein Oligonucleotid (Fa. Pharmacia) eingesetzt, welches die SspI-Schnittstelle des pGEM3Z in eine StuI-Stelle verwandelt:

Selektionsprimer: 5' CTCTTCCTTTTTCAGGCCTATTGAAGCATTTATCAGG 3'

Tabelle 2-9
Mutationsprimer

Primernamen	Primersequenz
hUCP3 <i>S. cerevisiae</i> . hUCP3mu1hefecu (Arg 54; cgg)	5' GGAGAACCAGGCTGTCCAGACAGCCAG <u>ACT</u> AGTG CAGTACCGTGG3'
hUCP1 <i>E. coli</i> hUCP1mu1e.coli (NdeI; CATATG)	5' GAGCTAGTAACCTATGATCTAATGAAGGAGG CAT <u>TT</u> GTGAAAAACAAC3'
hUCP2 <i>E. coli</i> h2R95T	5'CAGGCCGAT <u>GGT</u> GAGAGAAGCAAAGCTC 3'
hUCP3 <i>E. coli</i> h3D27N h3R94T h3R187Q h3R281Q h3E173Q h3D163N	5' CCTGTTTTGCTA <u>AC</u> CTGGTTACC 3' 5' CTTCGCCTCCATC <u>AC</u> GATCGGCCTC 3' 5' CCAACATCATGC <u>AGA</u> AATGCTATCG 3' 5' CTCCTTTTTG <u>CAG</u> TTGGGATCCTGG 3' 5' CATCGCCAGGGAG <u>CA</u> AGGAGTCAGGGGC 3' 5' CAGCGGGACTATGA <u>AC</u> GCCTACAG 3'

2.2.9. Herstellung kompetenter Zellen in *Sacharomyces cerevisiae*

Für die Vorkultur wurden 4 ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 30°C und 200 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur wurde mit 1ml der Vorkultur angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 1 angezogen. Nach 5 min Zentrifugation der Zellen bei 3500 rpm und 4 °C, Waschen der Zellen mit bidest. Wasser und erneuter Zentrifugation wurde die Lithiumacetat-Methode (Steams et al. 1990) angewandt, welche die Zellen aufnahmefähig für DNA macht. Dafür wurden die Zellen in 500 µl Lithiumacetat-Puffer (1/100 des Anzucht volumens) resuspendiert und 30 min unter leichtem

Schütteln im Wasserbad (30 °C) inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert und bei –78 °C eingefroren.

2.2.10. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung der kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 4 ml LB-Medium (mit Tetracyclin versetzt) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur, 80 ml LB-Medium mit Tetracyclin versetzt, wurde mit 800 µl Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte OD_{578nm} von 0.4 bis 0.5 (exponentielle Wachstumsphase) angezogen. Nach zehnminütigem Abkühlen der Zellen auf Eis erfolgte deren Ernte durch 15 min Zentrifugieren bei 4 °C und 10.000 rpm. Die Zellen wurden vorsichtig entsprechend 1/3 des Kulturvolumens im Puffer TFB1 resuspendiert und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugieren bei 4 °C und 7500 rpm wurde das Zellpellet mit dem Puffer TFB2 vorsichtig überschichtet, zehn Minuten auf Eis inkubiert und abschließend bei –80 °C in Form von 200 µl Aliquots eingefroren.

TFB1: 100 mM KCl, 30 mM KAc, 60 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5.8 mit 0.2 M CH₃COOH eingestellt

TFB2: 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, 10 mM MOPS, pH 6.8 mit 5 M NaOH eingestellt

2.2.11. Transformation in Hefezellen

Die bei –78 °C eingefrorenen kompetenten Hefezellen wurden 5 min auf Eis angetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Die Transformationsansätze wurden 30 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und nach Zugabe von 700 µl PEG-Puffer weitere 60 min bei 30 °C. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 5 min und die in 200 µl bidest. Wasser aufgenommenen Zellpellets wurden auf uracildefizienten Platten ausgestrichen und über zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.12. Transformation in *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA (bis zu 2 µg) oder eines Ligationsansatzes (100 ng) in *E. coli* wurden die bei –78 °C eingefrorenen kompetenten Bakterienzellen auf Eis ca. 15 min

aufgetaut, mit der ligierten oder Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis und folgende 60 sec bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Nach ein- bis zweiminütigem Abkühlen der Zellen auf Eis wurden sie in 1 ml LB- bzw. SOC-Medium 1 h bei 200 rpm und 37 °C geschüttelt und 200 µl dieser Suspension auf LB-Antibiotika-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.13. Proteinexpression

Für die Expression von UCP in *S. cerevisiae* wurde von den transformierten Hefezellen eine Vorkultur hergestellt. Dafür wurden 50 ml Minimalmedium mit einer Kolonie, bei der der *S. cerevisiae*-Zellstamm W303 das Plasmid pEMBLyex4-UCP enthielt, angeimpft und über Nacht bei 200 rpm und 29,5 °C geschüttelt. Aus der Vorkultur wurden 600 ml Hauptkultur in Ferembachkolben auf eine OD₅₇₈ von 0.01 verdünnt und bei 29,5 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Expression von UCP wurde bei einer OD₅₇₈ von 0,5 (nach ca. 14 h) mit 2 % Galactose induziert. Bei einer OD₅₇₈ von 3,0 (nach ca. 6 h) wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation bei 8000 rpm, 4°C, 10 min) und zweimal mit sterilem Eiswasser gewaschen.

Zur Anzucht der transformierten *E. coli*-Zellen BL21(DE3)pLysS, die das Plasmid pET24a-UCP enthielten, wurden 50 ml LB-Medium (Kanamycin⁺, Chloramphenicol⁺) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Mit einem geeigneten Volumen der Vorkultur, die bei 37 °C und 200 rpm über Nacht wuchs, wurde die Hauptkultur (500 ml LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol versetzt) in Fernbachkolben angeimpft, um eine anfängliche OD₅₇₈ von 0,1 zu erreichen. Für die Expression von UCP wurde die Hauptkultur bei 200 rpm und 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bis 0,6 angezogen und durch Zugabe von 1mM IPTG (Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid) induziert und nach 2,75 h (OD₅₇₈ ca. 1,6) durch Zentrifugation abgeerntet und pelletiert bei -20 °C eingefroren.

2.2.14. Isolierung von Mitochondrien

Die Isolierung der Mitochondrien aus Hefe erfolgte mit einigen Modifizierungen nach der Methode von Gawaz (Gawaz et al., 1990). Durch enzymatische Verdauung der Zellmembran mit Novozym (0.3 mg/g Zellen Nassgewicht) und Zymolyase (1mg/g Zellen Nassgewicht) in 1.2 M Sorbitol, 20 mM KH₂PO₄, pH 7.2 (PufferA) wurden die Protoplasten bei 30 °C präpariert. Dabei nahm die OD₅₇₈ von 30 µl durch Verdünnung der Zellsuspension in 3 ml

Puffer B (0.6 M Mannitol, 20 mM Tris, pH 7.4) um ca. 50 % ab und die Kontrolle unter dem Mikroskop ergab weitestgehend Protoplasten. Nach Entfernen der Enzyme durch zweimaliges Waschen mit 1.2 M Sorbitol wurden die Protoplasten in Puffer C (0.6 M Mannitol, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.1 % BSA, 20 mM Tris/HCl, pH 7.4) aufgenommen und mit einem Teflonstempel in einem Glaspotter homogenisiert. Die Isolierung der Mitochondrien wurde durch differentielle Zentrifugation (2360 rpm zum Entfernen von Zellbestandteilen und 10000 rpm zur Mitochondriensedimentation) bei 4°C erreicht. Das verbleibende Mitochondrienpellet wurde in Puffer C ohne BSA resuspendiert und die Proteinkonzentration (siehe Punkt 2.2.24.1.) bestimmt. Aus 10 g Zellen konnten in der Regel 10 mg Mitochondrien gewonnen werden, die auf Eis aufbewahrt wurden, um am gleichen Tag die Membranpotentialmessungen (siehe Punkt 2.2.16) vorzunehmen.

2.2.15. Membranpotentialmessungen an Mitochondrien

Der Verlauf des Membranpotentials an isolierten Mitochondrien wurde fluoreszenzspektroskopisch bei 14 °C untersucht. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde DisC3 verwendet, dessen Fluoreszenz mit zunehmendem Potential abnimmt („quenching“) und dessen Anregungswellenlänge bei 622 nm und Emissionswellenlänge bei 670 nm lag. In 400 µl Messvolumen wurden 2.4 mg/ml isolierte Mitochondrien (Proteinendkonzentration 15 µg/ml) in 0.56 M Mannitol, $K_xH_yPO_4$, 0.025 % BSA, pH 6.8 und 100 nM DisC3 suspendiert. Nacheinander wurden 110 µM Glycerinphosphat, 50 µM Laurinsäure und 250-500 µM GDP bzw. GTP zugesetzt sowie zur vollständigen Entkopplung des Membranpotentials 1 µM Valinomycin.

2.2.16. Reinigung der Inclusion Bodies

Bei der Expression der Uncoupling Proteine in *E. coli* entstanden Inclusion Bodies (Einschlußkörperchen, IB), in denen sich das UCP abgelagerte. Für den Aufschluß der *E. coli*-Zellen wurde das Zellpellet in Lösung 1 (50 mM Tris/ HCl, 25 % Saccharose, pH 8.0) resuspendiert und nach Zufügen von Lysozym (10 mg/g *E. coli*) 1 h bei 37 °C inkubiert. Zu der Suspension wurden weitere 10 ml Lösung 1 sowie 18.5 mM EDTA, 3 % Triton X-100 und 3 mM PMSF hinzugegeben. Die Mischung wurde mit dem Branson Sonifer 250 ultraschallt (50-100 Pulse). Nach Zentrifugation bei 16.000 rpm, 30 min und 4 °C wurde das Pellet in 20 ml Lösung 2 (1 M Urea, 3 % Triton X-100, 0.1 % β-Mercaptoethanol, pH 7.5)

sowie 2 mM PMSF aufgenommen und wie bereits oben beschrieben, beschallt und zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt und danach folgte ein Waschschrift mit Lösung 3 (2mM Tris/ HCl, 3 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 0.1 % β -Mercaptoethanol, pH 8.0). Die so aufkonzentrierten und aufgereinigten IB wurden in einem geeigneten Volumen von 10 bis 20 ml Lösung 4 (50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, β -Mercaptoethanol, pH 8.0) resuspendiert, à 1 ml Portionen zentrifugiert und bei – 78 °C eingefroren.

2.2.17. Renaturierung der Inclusion Bodies

Für die Solubilisierung der als Inclusion Bodies vorliegenden Uncoupling Proteine wurde nach einer Methode von Winkler (Winkler et al., 2000) ein mit 2 % Sarcosyl versetzter Puffer E (50 mM NH_4HCO_3 , 3 mM PMSF, 2 mM DTE, 1 mM EDTA, pH 8.0) verwendet. Das so resuspendierte Pellet wurde 30 min bei 4 °C vorsichtig geschüttelt. Dabei betrug das Lösungsvolumen anfänglich 100 μl Sarcosyl/ Puffer E-Lösung. Wenn die Lösung nach dem Schüttelvorgang nicht farblos war, wurden weitere 100 μl Sarcosyl Puffer E-Lösung zugegeben, bis sich das IB-Pellet vollständig aufgelöst hatte. Nach Verdünnen der gelösten UCP-IB mit Puffer E auf 0.5 % Sarcosyl Endkonzentration folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 13000 rpm für 30 min. Die Proteinendkonzentration im Überstand sollte bei 3 mg/ml liegen.

Da Sarcosyl die für die UCPs charakteristische Nucleotidbindung als auch die Renaturierung stört, wurde Sarkosyl gegen Digitonin ausgetauscht. Hierfür wurde das Protein von 3 mg/ml auf 0.6 mg/ ml mit Puffer F (100 mM Kaliumphosphat, 0.2 % wasserlösliches Digitonin, 0.1 % Sarcosyl, 1 mM DTE, 50 mM β -Thioethanol, pH 8.0) verdünnt und 20 min auf Eis inkubiert. Auf eine Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 30 min) folgte eine Druckdialyse mit einer Sarcosyl durchlässigen Membran (Ultrafiltration Membranes, 10 PM 10, 24 mm, Amicon Corporation) bei 4° C. Der Überstand, der das Protein enthielt, wurde in vier Schritten mit Puffer G (100 mM Kaliumphosphat, 0.1 % wasserlösliches Digitonin, 1 mM DTE, 1 mM EDTA, pH 8.0) dreifach aufkonzentriert und mit Puffer G wieder auf das Ausgangsvolumen verdünnt. Danach kamen zwei weitere Dialyseschritte mit Puffer H (10 mM Kaliumphosphat, 1 mM DTE, 1 mM EDTA, pH 8.0), so dass schließlich die Proteinkonzentration bei 1.2 bis 1.6 mg/ ml und die Digitoninkonzentration bei 0.5 % lagen.

Zur vollständigen Entfernung von Sarcosylresten wurden 500 μl der in Digitonin renaturierten UCP-IB mit dem Anionenaustauscherharz 21 K Dowex (mesh 20 bis 50, 365 mg Cl^- -Form + 43 mg normale OH^- -Form) versetzt und vorsichtig über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Das re-

naturierte UCP wurde in 60 µl-Portionen bei -78°C eingefroren. Nach jedem Renaturierungsschritt wurde die Proteinkonzentration nach Lowry gemessen und ein SDS-Gel erstellt, um die Reinheit zu prüfen und mögliche Proteinabbauten durch Proteolyse oder Aggregation zu beobachten.

2.2.18. Rekonstitution von UCP in Phospholipidvesikeln

Die Rekonstitution von den humanen UCPs in Phospholipidvesikeln wurde hauptsächlich nach einer von Klingenberg (Winkler et al., 1992) entwickelten Methode durchgeführt. Die Liposomen stellten eine künstliche Membran dar, in welche die UCPs eingebaut und ihre Transporteigenschaften untersucht wurden.

Für die Rekonstitution von UCP zur Bestimmung des Protonentransportes wurden 10 mg PC, das nach einer Methode von Wells und Hanahan, 1969 aus dem Eigelb frischer Hühnereier isoliert wurde, in 60 µl Methanol resuspendiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels unter N_2 -Begasung wurden zu dem viskosen PC 2.3 % C_{10}E_5 , 100 mM Kaliumphosphat, 0.4 mM EDTA, pH 7.2 pipettiert und mit dest. Wasser auf ein Endvolumen von 600 µl in 1.5 ml Cups aufgefüllt. Zum Lösen des PC in dem C_{10}E_5 -Puffer wurden die Cups 2 mal 30 sec kräftig gemixt und danach ½ h bei RT und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Vesikellösung 1 min auf Eis gekühlt und vorsichtig mit 30 µg renaturiertem Protein und 2 mM DTE vermischt. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten wurde die Protein/ Vesikel-Mischung mit N_2 kurz begast und im Kühlraum bei 4°C und 200 rpm geschüttelt. Zur Entfernung des C_{10}E_5 wurden Biobeads (Amberlite) in 4 x 30 mg und 4 x 60 mg Portionen alle 20 min zugekippt. Anschließend wurde die letzte Portion von 80 mg Amberlite nach 1.5 bis 2 h hinzugefügt. Die Proben wurden über Nacht bei 150 rpm geschüttelt und am nächsten Morgen vom Amberlite durch Zentrifugation (90 rpm, 4°C , 10 min) wieder getrennt. Zur Entfernung von externem Kaliumphosphat wurden 300 µl der Vesikellösung über eine Sephadex G-75 Säule (Φ 0.6 x 20 cm, 16 ml/ml Vesikel) mit dem Laufpuffer (280 mM Sucrose, 0.5 mM HEPES, 0.2 mM EDTA, pH 7.2) eluiert. Der Puffer enthielt Sucrose, um die externe Osmolarität der internen Salzkonzentration anzugleichen. Die milchigen Fraktionen wurden zu einem Gesamtvolumen von 600 µl gesammelt, da durch die Gelfiltration die Vesikellösung ungefähr um das Zweifache verdünnt wurde.

Die Herstellung der Vesikel für den Chloridtransport erfolgte in den Grundzügen wie die Rekonstitutionsmethode für den Protonentransport. Wiederum wurden 10 mg PC in 60 µl Me-

thanol gelöst und durch N₂-Begasung vom Lösungsmittel befreit. Das PC-Pellet wurde mit 2.3 % C₁₀E₅, 100 mM Natriumphosphat, 0.4 mM EDTA, 0.2 mM DTE, pH 6.2 resuspendiert und wie unter Kap. 2.2.18.1. beschrieben gemixt. Die zugeführte Proteinkonzentration betrug 30 µg/ml Vesikellösung und das Endvolumen 600 µl. Zu der bei 4 °C vorsichtig schüttelnden Protein/ Vesikel-Lösung wurden alle 20 min Biobeads (Amberlite) in 5 x 70 mg und 1 x 140 mg Portionen zugegeben. Nach insgesamt 5 h wurde das Amberlite bei 4° C und 90 rpm in 10 min abzentrifugiert. Zu 300 µl der Vesikellösung wurden 3 mM mQAE schnell hinzugefügt und das Gefäß mit Alufolie abgedunkelt, kurz gemixt und bei 4 °C aufbewahrt. Über Nacht diffundierte der Fluoreszenzfarbstoff mQAE in die Vesikel hinein. Die Abtrennung des äußeren mQAE vom Vesikel (nicht in den Vesikel diffundierter Farbstoff) erfolgte über eine Sephadex G-75 Säule (Maße, siehe oben in Kap. 2.2.18.), die mit 50 mM Sucrose, 0.5 mM HEPES, 0.5 mM PIPES, 0.2 mM EDTA, pH 7.0 äquilibriert war. Die gesammelten 600 µl Vesikelsuspension wurden sofort vermessen, weil das mQAE sonst aufgrund der Elutionsverdünnung wieder aus dem Vesikel herausdiffundiert. Das interne Volumen der Proteoliposomen wurde basierend auf den Messungen der internen Phosphatkonzentration von Fiske und Sabbarow (1925) nach Durchführung der G-75 Gelfiltration bestimmt. Es ergab 3 % des Vesikelvolumens (~ 3 µl/mg Phospholipid).

2.2.19. Protonentransportmessung

Die Messung des Protonentransportes wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer bei einer Anregungswellenlänge λ_{ex} = 467 nm und einer Emissionswellenlänge λ_{em} = 510 nm durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde der pH-Indikator Pyranin benutzt, dessen Fluoreszenz mit abnehmendem pH-Wert stark zurückgeht. Pyranin wurde bei einer Endkonzentration von 6 µM zu der fertigen Vesikellösung (600 µl) gegeben. In einer Quartzküvette (5 x 5 mm) wurden 50 µl der Vesikellösung, beladen mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.2, mit 280 µl eines isoosmolaren Puffers L (265 mM Sucrose, 1 mM HEPES, 0.8 mM EDTA, pH 7.2) verdünnt, so dass sich rechnerisch 1.26 mg Phospholipid/ ml Lösung und 3.8 mg Protein/ ml Lösung bei 10 °C ergaben. Der Messbereich wurde entsprechend dem Protonentransport und dessen Inhibierung bei nativem haUCP1 zwischen pH 6.8 und pH 7.2 gewählt. Für den Nullwert pH 6.8 wurden 280 µl Puffer M (27 mM MOPS, 0.265M Sucrose, 0.48 mM HEPES, 0.17 mM EDTA, pH 6.8) mit 50 µl Vesikellösung versetzt, wohingegen bei pH 7.2 der Puffer L verwendet wurde. Zu der zu vermessenden Vesikellösung in Puffer L wurden zuerst die Cofaktoren 6 µM Ubichinon in 2 µl Dichlormethan und 125 µM Laurinsäure pipettiert und mit

niedrigmolarer Schwefelsäure auf pH 6.8 justiert. Durch Zugabe von 2.5 μM Valinomycin, das außerhalb des Vesikels ein positiv geladenes K^+ -Diffusionspotential erzeugt, wurde der Protonentransport initiiert. Das daraus resultierende Membranpotential mit negativem Vorzeichen in den Vesikeln bewirkte einen Influx der positiv geladenen H^+ -Ionen, der durch UCP katalysiert wird. Der pH-Anstieg im Medium führte schließlich zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Die gesamte H^+ -Aufnahmekapazität des Vesikels wurde durch Hinzufügen des Entkopplers CCCP (1 μM) ermittelt. Als Kalibrierung wurde H_2SO_4 in 10 nmol H^+ -Schritten zugesetzt. Für die Bestimmung der Inhibierung des Protonentransportes durch Purinnucleotide wurden μmolare Mengen ATP und ADP (0.25 μM bis 20 μM ATP bzw. ADP) vor der CoQ_{10} -Zugabe unter die Messlösung gemischt. Um unspezifischen Protonentransportaktivitäten, die aus dem Lösungsmittel CH_2Cl_2 resultierten, erfassen zu können, erfolgte für jede UCP-Isoform auch eine Protonentransportmessung mit CH_2Cl_2 ohne CoQ_{10} .

2.2.20. Berechnung des Protonentransportes

Die relative Protonentransportaktivität v/c in den Einheiten $\mu\text{mol}_{\text{H}^+ \text{relativ}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{Pr}}^{-1}$ der Uncoupling Proteine berechnete sich aus dem Quotienten der einströmenden H^+ -Transportaktivität v ($\mu\text{mol}_{\text{H}^+ \text{absolut}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{Pr}}^{-1}$) und der Protonenaufnahmekapazität c des Vesikels ($\mu\text{mol}_{\text{H}^+ \text{gesamt}}$). Durch das Valinomycin wurde der H^+ -Transport ausgelöst und die Steigung zwischen pH 6.8 und pH 7.2 als v ermittelt.

2.2.21. Chloridtransportmessung

Bei dem Chloridtransport wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität des Cl^- -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs mQAE innerhalb des Vesikels gemessen. Die Chloridtransportgeschwindigkeit wurde in Einheiten von nmol/ min nach einer 2-Punkt-Kalibrierungsmethode von Verkman et al. (1989) bestimmt. Für die Messung am Fluoreszenzspektrometer bei 10 °C mit einem Wellenlängenbereich von $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ wurden 25 μl der UCP beladenen Proteoliposomen ohne Fluoreszenzfarbstoff mit 360 μl 4 mM Natriumhydrogenphosphat, 155 mM Kaliumchlorid, pH 6.8 (Puffer N) verdünnt. Die Fluoreszenzintensität F_0 der Protein/ Vesikellösung konnte so in Gegenwart von Chlorid ermittelt werden. Die maximale Fluoreszenzintensität F_i resultierte aus 50 μl mQAE-haltiger Vesikellösung gemixt mit dem Puffer N zu einem Endvolumen von 385 μl und stellte den Startpunkt für die Chloridtransportmessungen dar. Die Endkonzentrationen betrugen für das Protein 3.2 mg

Protein/ ml Lösung und für das Phospholipid 1.1 mg PL/ ml Lösung. Durch Zugabe von 2 μM Valinomycin wurde der Cl^- -Transport ausgelöst, indem Kalium aufgrund seiner höheren Konzentration außerhalb des Vesikels in das Vesikelinnere diffundierte und dort ein positives Kaliumdiffusionspotential erzeugte, was wiederum zum Einstrom von Chlorid-Ionen über UCP führte. Das Fluoreszenzquenching von mQAE stieg mit zunehmender Cl^- -Konzentration an. Die Fluoreszenzintensität (F_s) entsprechend der externen Chlorid-Konzentration (155 mM) wurde am Ende jeden Experiments durch Hinzufügen von 40 μM Tributylzinnacetat berechnet. Tributylzinnacetat katalysiert den Chloridtransport durch Membranen und verursachte die vollständige Äquilibration mit dem externen Chlorid.

2.2.22. Berechnung des Chloridtransportes

Die Geschwindigkeit des Chlorideinstroms wurde nach Verkman et al. (1989) bestimmt. Dafür wurden die Anfangsgeschwindigkeit der Änderung der mQAE-Fluoreszenzintensität und die Stern-Volmer-Quenchingkonstante K_{Cl} betrachtet. Die Löschung (Quenching) von mQAE durch Chlorid wurde über folgende Stern-Volmer Gleichung dargestellt:

$$F_o/F = 1 + K_{\text{Cl}} [\text{Cl}] \quad (1)$$

F_o : Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Chlorid

F : Fluoreszenzintensität in Gegenwart von Chlorid

$$[\text{Cl}] = (F_o/K_{\text{Cl}}) (1/F) - (1/K_{\text{Cl}}) \quad (2)$$

differenziert nach der Zeit:

$$d[\text{Cl}]/dt = (F_o/K_{\text{Cl}}) (1/F^2) (dF/dt) \quad (3)$$

mit $t \rightarrow 0$ und $F_o \approx F$ folgte daraus:

$$(d[\text{Cl}]/dt)_{t=0} = (-1/K_{\text{Cl}} F_o) (dF/dt)_{t=0}. \quad (4)$$

Dabei stellte F_o die gesamte Fluoreszenzintensität innerhalb des Vesikels dar und wurde aus einer 2-Punkt Kalibrierung berechnet:

$$F_o/F_i = 1 + K_{\text{Cl}} [\text{Cl}]_i \text{ und } F_o/F_s = 1 + K_{\text{Cl}} [\text{Cl}]_s \quad (5)$$

$$(F_i - F_s) = (F_o/1 + K_{\text{Cl}}[\text{Cl}]_i) (F_o/1 + K_{\text{Cl}}[\text{Cl}]_s) \quad (6)$$

mit $[\text{Cl}]_i$ und $[\text{Cl}]_s$ = intraliposomale und externe Chloridkonzentration

und F_i und F_s = Start- und Endfluoreszenzintensitäten von mQAE

$$F_o = (F_i - F_s) (1 + K_{\text{Cl}}[\text{Cl}]_i) (1 + K_{\text{Cl}}[\text{Cl}]_s)/K_{\text{Cl}} ([\text{Cl}]_s - [\text{Cl}]_i) \quad (7)$$

Da die initiierende Chloridkonzentration in den Vesikeln gleich Null war, ergab sich für F_o

$$F_o = (F_i - F_s) (1 + K_{Cl}[Cl]_s)/K_{Cl}[Cl]_s \quad (8)$$

Und für die Chlorideinstromgeschwindigkeit J_{Cl} :

$$J_{Cl} = [(F_i - F_s) (K_{Cl} + 1/[Cl]_s)]^{-1} [dF(0)/dt] \quad (9)$$

2.2.23. Messung der Proteinbindung mit fluoreszierenden Nucleotid-Derivaten

Die Bindung von Dansyl-GTP (DANS-GTP) bzw. Dansyl-GDP (DANS-GDP) an UCP wurde nach einer Methode von Huang et al. (1995) durch Titration von UCP in einer Küvette, 5 x 5 mm mit einem Endvolumen von 325 μ l bei einer Anregungswellenlänge von λ_{ex} = 350 nm und einer Emissionswellenlänge von λ_{em} = 515 nm gemessen. Als Standard wurde natives haUCP1 verwendet, das bei einer Konzentration von 35 μ g Protein/ ml Suspension mit 500 μ M DANS-GTP bzw. -GDP gesättigt wurde. Zur Messung der Bindung von Purinnucleotiden an IB-UCP wurden bei 10 °C 77 mM MES/ HEPES, pH 6.5, 0.3 % Digitonin und 45 μ g/ ml renaturiertes Protein gemixt und 500 μ M DANS-GTP bzw. -GDP hinzugefügt. Die spezifische Fluoreszenz (ΔF), die aus der Bindung an die Nucleotidbindungsstelle von UCP resultierte, wurde durch Subtraktion der gesamten Fluoreszenz minus der restlichen Fluoreszenz (unspezifische Fluoreszenz) bestimmt. Letztere wurde durch Zugabe von 1.5 mM ATP oder ADP gemessen. Als Standard für die Fluoreszenz wurde der Fluoreszenzfarbstoff Quinin benutzt (100 Fluoreszenzeinheiten = Fluoreszenz von 2 μ M Quinin in 1N H_2SO_4). Die Bindungsstärke der Purinnucleotide an die renaturierten IB-UCPs wurde prozentual im Verhältnis zum nativen haUCP1 ermittelt.

2.2.24. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry und mit Amido Black

Die Proteinkonzentration der isolierten Mitochondrien aus Hefe sowie der gereinigten Inclusion Bodies aus *E. coli* wurde nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) bestimmt. Als Eichprotein wurde BSA in den Mengen 2, 5, 10, 15, 20, 50 μ g verwendet. Die isolierten Mitochondrien aus Hefe wurden in Gegenwart von 1% SDS abgeschätzt, während die Inclusion Bodies in 0,5 % Sarcosyl/ NH_4HCO_3 -Puffer, pH 8.0 (siehe Punkt 2.2.18.) solubilisiert wurden.

In die Berechnung der Protonentransportaktivität fließt die in die Vesikel eingebaute Proteinmenge ein. Wegen des hohen Lipidanteils der Proteoliposomen wurde die Proteinkonzentration nach der Amido Black Methode (Kaplan et al., 1985, Schaffner et al., 1973) er-

mittelt. BSA wurde als Eichprotein in den Mengen 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 µg eingesetzt. Zu den Standardproben wurden 2,5 mg PC zugegeben. Für die Messung wurden nach der G-75 Elution 300 µl UCP-Vesikellösungen auf 2 ml mit dest. Wasser verdünnt. Genauso wurde mit den Eichlösungen und dem Nullwert für die Proteoliposomen, 300 µl eluierte Leervesikel (Vesikel ohne UCP), verfahren. Nacheinander wurden zu allen Messlösungen 200 µl 10 % SDS, 300 µl 1M Tris/ HCl, 1% SDS, pH 7.5 und 600 µl 104 % Trichloressigsäure zugegeben und gemischt. Nach 3 min wurden die Proben auf einen Millipore Filter (Typ HAWP 02400, 0.45 µm, 24 mm) pipettiert, unter Vakuum abgesaugt und mit 2 ml 6 % TCA gewaschen. Es folgte ein 3 min Färbevorgang in 0.1 % Amido Black 10B, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure und anschließend drei 1 min andauernde Entfärbeschritte in 90 % Methanol, 2 % Essigsäure. Danach wurden die Filter getrocknet und in je 1 ml Elutionslösung (25 mM NaOH, 0,05 mM EDTA, 1 % SDS, 50% Ethanol) 15 min bei RT und 200 rpm geschüttelt. Die Adsorption des Eluats wurde bei 630 nm gegen H₂O gemessen und die Proteinkonzentration konnte direkt aus der Eichkurve erstellt werden.

2.2.25. Nachweis von UCP in den Mitochondrien

Um den Anteil des in die Hefemitochondrienmembran eingebauten Proteins qualitativ nachzuweisen, wurden 1,2 mg isolierte UCP-haltige Mitochondrien 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 40 µl NH₄Ac, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 6.7 resuspendiert, 30 min bei 0 °C inkubiert und mit 80 µl 1mM PMSF gemixt. Von den 120 µl der Gesamtlösung (10 mg Protein/ ml Lösung) wurden 10 µl entnommen und 10 min bei 43.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. In dem Überstand befindet sich das UCP-Protein, das nach Klingenberg et al. (1999) in seiner aktiven Form in Triton löslich ist und in die Mitochondrienmembran eingebaut werden kann. Mit 10 µl Überstandslösung als auch 10 µl der Gesamtlösung wurde eine SDS-Gelelektrophorese (siehe Punkt 2.2.28.) durchgeführt, mit dem der in die Membran eingebaute UCP Anteil qualitativ bestimmt werden konnte.

2.2.26. Nachweis von Inclusion Bodies von *E. coli*

Zum Nachweis der Rekonstitution des renaturierten IB-Proteins aus *E. coli* in Liposomen wurde das UCP nach der Elution über die G-75 Säule wieder aus den Vesikel extrahiert. Dafür wurden 600 µl Vesikellösung bis zur absoluten Trockenheit lyophilisiert und das verbleibende Pellet mit 200 µl absolutem Methanol resuspendiert und bei 4 °C und 13.000 rpm 5

min zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten mit 50 % Methanol wurde das getrocknete Pellet in 4 % SDS-Gelelektrophoresepuffer gelöst und auf ein Gel aufgetragen.

2.2.27. SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der mit SDS denaturierten Proteine erfolgte mit 8.5 x 10 x 0.05 cm Laemmli-Gelen (Laemmli, 1970), die aus einem 5,4 % Polyacrylamid-Sammelgel und einem -Trenngel bestanden mit dem Elektrodenpuffer (0,05 M TRIS, 0,3 M Glycin, 0,1 % SDS, pH 8.3). Die Elektrophorese wurde bei 100 V innerhalb des Sammelgels und bei 200 V innerhalb des Trenngels ausgeführt. Anschließend wurde das Gel 20 min in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure fixiert, 20 min mit 0,2 % Coomassie-Blau (0,2 % Coomassieblau G 250, 10 % Essigsäure) angefärbt und zur Entfernung des nicht gebundenen Proteinanteils mit 10 % Essigsäure entfärbt.

2.2.28. Immunoblot

Für den Immunoblot wurden die UCP Proteine von dem Polyacrylamidgel 45 min bei 80 mA auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Blottingpuffer bestand aus 0,024 M Tris, 0,19 M Glycin, 20 % Methanol, 0,08 % SDS, pH 8.3. Nach dem Waschen der Nitrocellulosemembran in 1 % PBS-Puffer (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl) und 1 h Schütteln in mit 5 % Milchpulver versetzten PBS-Puffer wurde die Membran mit dem, dem Protein entsprechenden Antikörper in PBS-Puffer (mit 5% Milchpulver) für 1,5 h unter Schütteln behandelt. Danach wurde die Membran in drei Schritten für jeweils 5 min mit PBS-Puffer, PBS-Puffer mit 0.05% Tween und nochmals mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Bindung des Anti-Antikörpers (Anti Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat) in einem mit 2,5 % Milchpulver versetzten PBS-Puffer bei einer Verdünnung von 1:10.000 für eine Dauer von 45 min. Nach Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorgangs wurde die Detektion der Proteine in der Dunkelheit in einer 1 bis 3 min Reaktion mit 2 % Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, 0,03 % Nickelsulfat, 0,03 % Kobaltsulfat, 0,01 % Wasserstoffperoxid in PBS-Puffer durchgeführt. Die Membran wurde nach der Farbentwicklung mit dest. Wasser gewaschen und getrocknet.

3. Ergebnisse

3.1. Expression der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Untersuchung von Struktur- und Funktionsbeziehungen der humanen UCP1, 2 und 3 sollten die Proteine in nativer Form in eine Mitochondrienmembran eingebaut werden. Da die hUCPs zu der Familie der mitochondrialen Carrier gehören, wurde versucht ähnlich wie beim AAC UCP aus den Hefemitochondrien zu isolieren. Die UCP-cDNAs wurden durch PCR mit den passenden Schnittstellen versehen, um sie in den Hefevektor pEMBLyex4 zu klonieren (Schnittstellen siehe unter Punkt 2.2.1.; hUCP1: 912 bp, hUCP2: 924 bp, hUCP3 936 bp). Bei dem Vektor pEMBLyex4 handelt es sich um ein Plasmid, dass die Expression von UCP durch Glucose stark reprimiert und durch Galactose stark induziert, weil die cDNA von UCP direkt hinter dem GAL/ CYC-Promotor liegt. Die Anzuchtbedingungen von *S. cerevisiae* wurden nach einer für das Plasmid pEMBLyex4-haUCP1 erfolgreich durchgeführten Vorschrift ausgewählt. Für die Proteinexpression wurden die Hefezellen bis zu einer OD₅₇₈ von 1 angezogen und mit 0.6 % Galactose induziert. Die Anzucht lief bei einer Temperatur von 29.5 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 rpm ab. Die Expressionsphase nach der Galactose-Induktion dauerte insgesamt 6 h. Währenddessen verlangsamte sich das Zellwachstum für alle pEMBLyex4-hUCPs im Vergleich mit den Kontrollzellen, die den Vektor ohne Insert enthielten, nur wenig. Die Generationsverdopplungszeit stieg um das 1.2 fache von 120 auf 150 min an. Qualitativ wurden die heterologen Expressionen von hUCP1, 2 und 3 in *S. cerevisiae* durch einen Immunoblot mit dem Antikörper AK haUCP1 dokumentiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit dem multiklonalen Antiserum gegen haUCP1 auch hUCP1 und hUCP2 nachgewiesen werden können, während der monoklonale Peptid-Antikörper AK hUCP3 A absolut spezifisch gegen hUCP3 reagierte. Mit dem Peptid-Antikörper AK hUCP3 B ließen sich sowohl hUCP3 (100 % Übereinstimmung mit der AS-Sequenz) als auch zum Teil hUCP2 immunologisch detektieren (siehe auch Tab. 3-1).

Tabelle 3-1

Nachweis der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 durch die eingesetzten Antikörper

	hUCP1	hUCP2	hUCP3
AK haUCP1	100 %	~ 40 %	0 %
AK hUCP3 A	0 %	0 %	100 %
AK hUCP3 B	0 %	~ 10 %	100 %

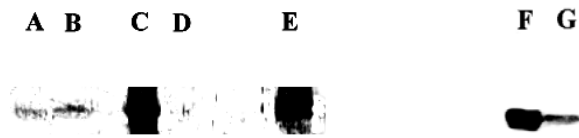


Abbildung 3-1

Immunoblots mit AK haUCP1 (links) und AK hUCP3 A (rechts). Die Hefeanzuchtbedingungen für die Expression der humanen Uncoupling Proteine im pEMBLyex4-Vektor wurden wie oben beschrieben durchgeführt und die isolierten mitochondrialen Fraktionen aufgetragen. A: hUCP1 75 µg, B: hUCP2, 87 µg, C: haUCP1, 50 µg, D: pEMBLyex4 ohne Insert, 50 µg, G: hUCP3 aus Hefe, 75 µg, Vergleichsproteine: E: haUCP1 HTS-extrahiert, isoliert und aufgereinigt, aus *S. cerevisiae*, 2 µg, F: Inclusion Bodies von hUCP3 aus *E. coli*, 7,5 µg (siehe hierzu auch Punkt 3.3.1.)

Als Negativkontrolle für den Immunoblot dienten Hefezellen, die den Expressionsvektor ohne die UCP-cDNA enthielten (Leerplasmid). Proteine wie der ADP-ATP-Carrier, der Phosphatcarrier und Porin kommen in der Hefezelle in vergleichbaren Mengen vor als UCP und haben ein ähnliches Molekulargewicht wie dieses (Molekulargewicht hUCP1: 33.009 Da, hUCP2: 33.228 Da, hUCP3: 34215 Da). Somit verlaufen deren Banden auf einem SDS-Gel auf gleicher Höhe und deshalb ist kein deutlicher Unterschied zwischen Mitochondrien mit UCP und der Kontrolle (ohne UCP) zu erkennen. Der Immunoblot mit dem AK haUCP1 zeigte nur schwer zu erkennende Banden von exprimierten hUCP1 und hUCP2 (Abb. 3-1, links). Mit dem AK hUCP3 A konnte auch eine Expression von hUCP3 in geringen Konzentrationen beobachtet werden (Abb. 3-1, rechts). Aufgrund der geringen Ausbeute wurden die Zellanzuchtbedingungen variiert. Zum einen wurde die Galactosemenge erhöht von 0.6 % auf 2.0 %, um die Expression der hUCP-cDNAs in dem pEMBLyex4-Plasmid zu steigern und gleichzeitig die Entstehung von Proteasen zu vermindern. Einige Literaturstellen weisen daraufhin, dass sich auch in Hefe Proteinaggregate in Form von Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) bilden können (Heidkämper et al., 1999). Möglicherweise kann eine zu hohe hUCP3-Konzentration nicht in gleicher Geschwindigkeit in die Mitochondrienmembran eingebaut werden wie sie entsteht und wird somit vielleicht als Inclusion Bodies abgelagert. Zur Verlangsamung der UCP-Einbaurrate in die Hefemitochondrienmembran wurde deshalb das Zellwachstum während der Expressionsdauer erniedrigt, indem nach der Galactose-Induktion die Schüttelgeschwindigkeit der Zellkulturen von 200 rpm auf 50 rpm verringert wurde. Der pH-Wert für das Medium wurde nach Arechaga (Arechaga, F. et al., 1993) und Fleury (Fleury

et al., 1997), die eine Entkopplung der Mitochondrien für UCP1 und UCP2 nachweisen konnten, von pH 6.0 auf pH 4.5 gesenkt.

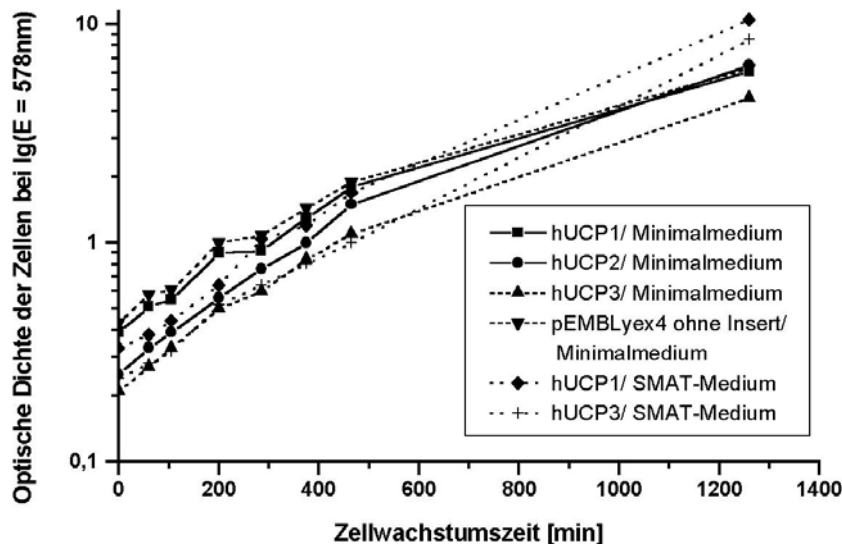


Abbildung 3-2

Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae* mit den Plasmiden pEMBLyex4-hUCP1, -hUCP2, -hUCP3 und der Kontrolle (Plasmid ohne Insert) in verschiedenen Medien.

Aufgrund der verminderten Schüttelgeschwindigkeit während der Expression nahm die Verdopplungszeit der *S. cerevisiae*-Zellen von 2 h auf 8 h zu. Des weiteren wurden auch nach einer Vorschrift von Hinz (Hinz, W. et al., 1999) zu der Zellkultur bei Vornahme der Galactose-Induktion die Nährstoffe 2 % Pepton und 1 % Hefeextrakt zusätzlich zugefügt (SMAT-Medium). Dadurch wurde das Zellwachstum einschließlich der Expressionsrate gesteigert. Aus der Abbildung 3-2 ist ersichtlich, dass sich das Zellwachstum während der Expressionsdauer mit dem SMAT-Medium schneller erhöht als mit dem Minimalmedium und dies auf eine geringere UCP-Expressionsrate hindeutet. Da die Unterschiede zwischen den UCP-Plasmiden und dem Kontrollplasmid im Minimalmedium nicht sehr groß sind, weist das auch auf eine niedrige Proteinexpressionsrate für UCP hin.

Das hUCP2-Protein war nur in Spuren zu erkennen (AK hUCP3 B). Wegen der möglichen IB-Bildung wurden die isolierten Hefemitochondrien zuerst mit dem stark ionischen Detergens SDS und anschließend mit dem neutralen Detergens Triton X-100 solubilisiert worden. Denn natives haUCP1 lässt sich aus der Hefemitochondrienmembran mit Triton extrahieren und Aggregate können durch Ultrazentrifugation abgetrennt werden. In dem Immunoblot der Abbildung 3-3 werden die Triton-extrahierten Hefemitochondrien vor und nach der Ultrazentrifugation dargestellt.

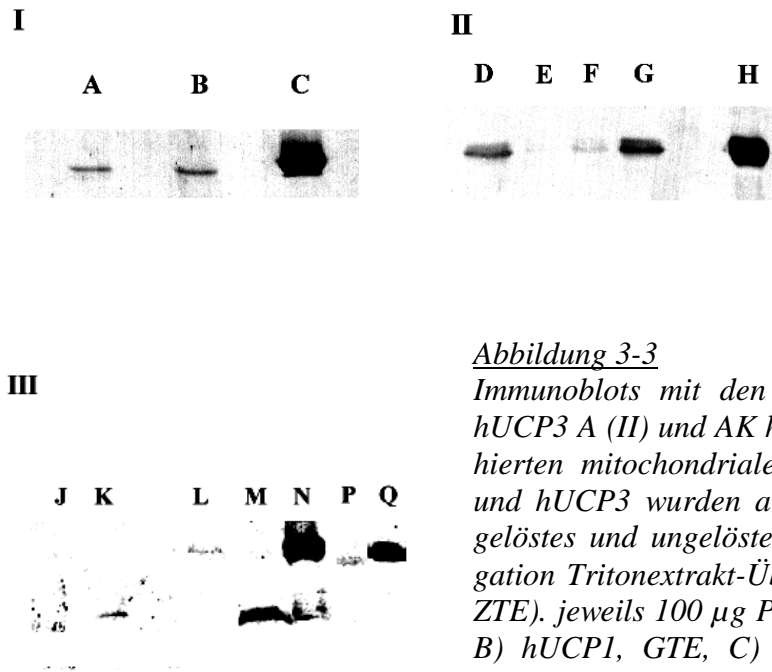


Abbildung 3-3

Immunoblots mit den Antikörpern AK haUCP1 (I), AK hUCP3 A (II) und AK hUCP3 B (III). Von den Triton-extrahierten mitochondrialen Fraktionen von hUCP1, hUCP2 und hUCP3 wurden als gesamter Tritonextrakt (in Triton gelöstes und ungelöstes Protein, GTE) und nach Zentrifugation Tritonextrakt-Überstand (in Triton gelöstes Protein, ZTE), jeweils 100 µg Protein aufgetragen. A) hUCP1, ZTE, B) hUCP1, GTE, C) Vergleichsprotein HTS-extrahiertes, aufgereinigtes haUCP1, 2,7 µg, D) hUCP3-R53(cgg→aga), GTE, E) hUCP3-R53(cgg→aga), ZTE, F) hUCP3, ZTE, G) hUCP3, GTE, H) Vergleichsprotein: 15 µg mitochondriales hUCP3, mit pGal-Vektor exprimiert in *S. cerevisiae* (Heidkämper et al., 1999), J) hUCP2, ZTE, K) hUCP3, SMAT-Medium, ZTE, L) hUCP2, GTE, M) hUCP3, SMAT-Medium, GTE, N) Vergleichsprotein wie H, P) Vergleichsprotein hUCP2, IB, *E. coli*, 2 µg, Q) Vergleichsprotein hUCP3, IB, *E. coli*, 15 µg

Der Immunoblot (Abb. 3-3) zeigt, dass das im Vergleich zu haUCP1 schwach exprimierte hUCP1 zur Hälfte und hUCP3 fast vollständig in Triton unlöslich waren und wahrscheinlich aggregiert in der Hefezelle vorlagen. Auch das mit SMAT-Medium angezogene hUCP3, das proteolytisch gespalten wurde, ist fast vollkommen in Form von IB ausgefallen. Die hUCP2 – Hefemitochondrien als gesamter Triton-Extrakt, der das Protein in gelöster und ungelöster Form enthielt, konnten nur als schwache Bande detektiert werden. Nach Abzentrifugieren des in Triton ungelösten Proteinanteils war keine Bande mehr zu erkennen. Jedoch ist die verminderte Nachweisstärke des Antikörpers AK hUCP3 B für hUCP2 mitzubetrachten.

Durch eine Senkung der Anzuchtstemperatur von 29.5 °C auf 28 °C wurde keine Änderung der Proteinaggregation erzielt.

Bei einem Vergleich der hUCP-cDNA-Sequenzen mit den Sequenzen anderer Carrier sowie der haUCP1 Sequenz fiel auf, dass die basische Aminosäure Arginin hauptsächlich durch die Basentriplets CGG, CGA und CGC codiert wurde (Tab. 3-2). Diese 3 Basentriplets sind für die Expression in *S. cerevisiae* sehr ungebräuchlich (Sharp, P.M. et al., 1986). Vor allem die

Tripletts CGG und CGA haben für hoch exprimierende Gene in Hefe einen RSCU-Wert von 0.00 (RSCU = Relative Synonymus codon usage).

Tabelle 3-2

Anzahl (N) der für Arginin codierenden Basentriplets (*cgc, cgg und cga*) verschiedener Arten, die für hochexprimierte Gene in *S. cerevisiae* ungebräuchlich sind

Art	Negativ codierende Basentriplets für Arginin	UCP1 (N)	UCP2 (N)	UCP3 (N)
Human	CGC	1	6	3
	CGG	2	4	6
	CGA	3	6	1
	Summe	6	16	10
Ratte	CGC	2	9	6
	CGG	1	6	2
	CGA	1	3	4
	Summe	4	18	12
Maus	CGC	2	9	6
	CGG	0	6	1
	CGA	1	1	3
	Summe	3	16	10
Hamster	CGC	2		
	CGG	0		
	CGA	1		
	Summe	3		

Da die cDNAs der Uncoupling Proteine aus Human eine sehr viel höhere Anzahl an *cga* und *cgg* Tripletts aufweisen als die UCP-DNAs der Nagetiere, wie aus der Tab. 3-2 ersichtlich ist, wäre es denkbar, dass die Translation der hUCP-DNAs stärker unterbrochen ist und weniger UCP-Protein exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde für die Expression von hUCP3 in *S. cerevisiae* das erste Arginin R53 mit der unvorteilhaften Sequenz *cgg* durch Mutation in die für *S. cerevisiae* vorteilhafte Sequenz *aga* umgewandelt. Aber auch diese Mutation führte zu keiner erkennbaren Änderung weder der hUCP3-Expression in Hefe noch dem Einbau in die Hefemitochondrienmembran (Abb. 3-3).

Durch Änderung der Kohlenstoffquelle in der Hefezellkultur, d.h. ein völliger Verzicht auf Glucose zugunsten einer gesteigerten Lactatkonzentration von 2 % auf 2.2 %, zeichneten sich auch keine Veränderungen bei der Proteinexpressionsrate oder dem Proteineinbau in die Mitochondrienmembran ab.

3.2. Wirkung der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 auf das Membranpotential der Mitochondrien

Durch Einbau von UCP in die Hefemitochondrien sollte sich das Membranpotential $\Delta\Psi$ ändern, das mit dem fluoreszierenden Farbstoff diSC3 registriert wurde. Als Standard-Mitochondrien wurde das haUCP1 pEMBLyex4-Plasmid verwendet (Bienengräber, 1999). Dabei wurde durch Zugabe von 100 μM Laurinsäure $\Delta\Psi$ um 75 % vermindert, was im Verhältnis zur Valinomycin-Zufuhr steht, die $\Delta\Psi$ um 100 % senkt. Durch GDP oder GTP konnte nach der Laurinsäure-Zugabe $\Delta\Psi$ zu 96 % wieder hergestellt werden.

Bei den hier dargestellten Versuchen wurde $\Delta\Psi$ der haUCP1-Hefemitochondrien mit 20 μM und weiteren 20 μM Laurinsäure um 23 % bzw. um 48 % verringert, wie in Abb. 3-4 und Tab. 3-4 dargestellt ist. Durch GDP wurde $\Delta\Psi$ zu 89 % wieder gesteigert.

Tabelle 3-3.

Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$ an Hefemitochondrien mit und ohne haUCP1.

Valinomycin-Zugabe = 100 % Verminderung des Membranpotentials $\Delta\Psi$

Zellanzuchtbedingungen:

A: 0.6 % Galactose für die Induktion, Wachstumstemp. 29.5 °C, pH-Wert des Mediums 6.0, Schüttelgeschwindigkeit bei der Expression 200 rpm, Minimalmedium;

B: 2 % Galactose für die Induktion, Wachstumstemp. 29.5 °C, pH-Wert des Mediums 4.5, Schüttelgeschwindigkeit bei der Expression 200 rpm (1.5 h)/ 50 rpm (17 h), Minimalmedium;

C: 3 % Galactose für die Induktion, Wachstumstemp. 30.0 °C, pH-Wert des Mediums 4.5, Schüttelgeschwindigkeit bei der Expression 70 rpm (22 h), 200 rpm (0.5 h), Minimalmedium;

D: 2 % Galactose für die Induktion, Wachstumstemp. 28.0 °C, pH-Wert des Mediums 4.5, Schüttelgeschwindigkeit bei der Expression 50 rpm (22 h)/ 200 rpm (1 h), Minimalmedium;

E: 2 % Galactose für die Induktion, Wachstumstemp. 29.5 °C, pH-Wert des Mediums 4.5, Schüttelgeschwindigkeit bei der Expression 200 rpm (2 h), 50 rpm (18 h), SMAT-Medium

Insert-Plasmid [ng]	Zell-anzuchtbe-dingungen	pH-Wert der Mess-lösung	LA-Kon-zentra-tion [μM]	Abnahme von $\Delta\Psi$ durch LA [%]	GDP bzw. GTP-Kon-zentration: 250 μM	Zunahme von $\Delta\Psi$ durch GDP/ GTP [%]
pEMBLyex4-haUCP1 (15ng)	A	6.8	20 40	23 48	GDP	89
pEMBLyex4 ohne Insert (15ng)	B	6.8	50	11	GTP	0
pEMBLyex4 ohne Insert (15 ng)	B	6.8	50 100	0 0	GDP	0
pEMBLyex4 ohne Insert (27 ng)	B	6.8	50	26	GDP	0

Auf Kontrollmitochondrien aus Hefezellen, die das Plasmid pEMBLyex4 ohne inseriertes UCP enthielten, hatten weder 50 μ M noch 100 μ M Laurinsäure einen entscheidenden Einfluß (Tab. 3-4). Für letztere spielte dabei eine Erhöhung der Galactose-Induktionsmenge oder eine Änderung der Zellwachstumsbedingungen wie die Verlangsamung der Schüttelgeschwindigkeit oder die Erniedrigung des pH-Wertes keine Rolle.

Die Abbildung 3-4 im Kapitel 3.2.1. zeigt, dass isolierte Mitochondrien ohne UCP1 vor Substratzugabe ein höheres Membranpotential aufweisen als Mitochondrien, die UCP1 enthalten. Mit NADH oder Glycerinphosphat als Substrat für die Atmung erreichte $\Delta\Psi$ von Mitochondrien mit und ohne UCP1 ein vergleichbares Niveau. Dies konnte sowohl für haUCP1 als auch für hUCP1 festgestellt werden.

3.2.1. Beeinflussung des Membranpotentials von Hefemitochondrien durch hUCP1

Das humane Uncoupling Protein 1 im pEMBLyex4-Plasmid konnte nur durch veränderte Zellbedingungen eindeutig in den Hefemitochondrien nachgewiesen werden. Durch die Erhöhung der Galactose-Induktionsmenge von 0.6 % auf 2 %, eine Verringerung der Schüttelgeschwindigkeit während der Proteinexpression von 200 rpm auf zeitweilig 50 rpm sowie eine Erniedrigung des pH-Wertes des Kulturmediums von pH 6.0 auf 4.5 wurde hUCP1 exprimiert und in die Membran eingebaut. Dadurch wurde $\Delta\Psi$ der Hefemitochondrien beeinflusst, wie in Abb. 3-3 dargestellt.

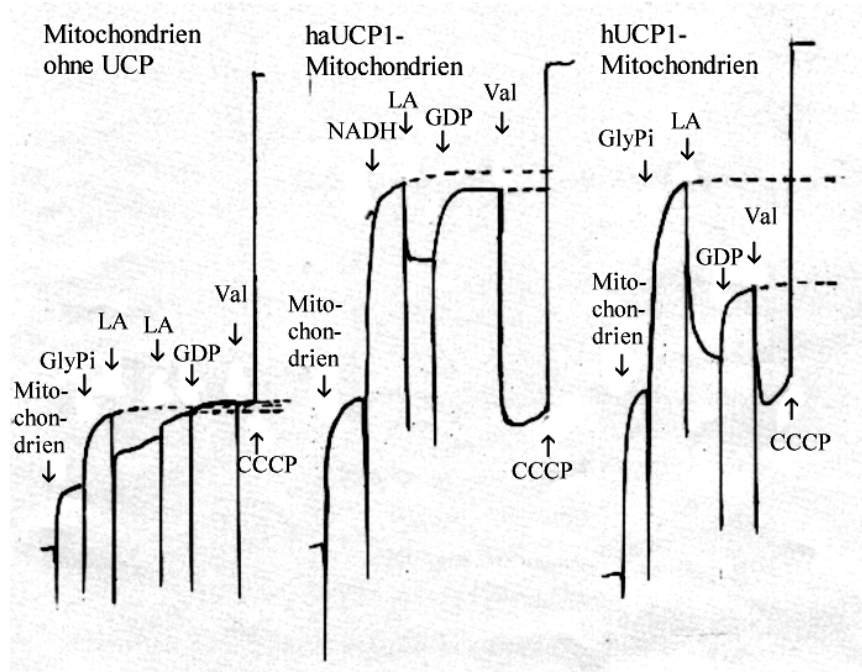


Abbildung 3-4
Messung des Membranpotentials von Mitochondrien ohne UCP (pEMBLyex4 ohne Insert, Tab. 3-3, Zellzuchtbedingungen B), mit haUCP1 (pEMBLyex4-haUCP1, Tab. 3-3, Zellzuchtbedingungen A) und mit hUCP1 (pEMBLyex4-hUCP1, Tab. 3-4, Zellzuchtbedingungen B)

Nach Zugabe von 50 μM Laurinsäure zu den Mitochondrien aus Zellen mit den Zellzuchtbedingungen B entkoppelte $\Delta\Psi$ fast vollständig (99 %; Valinomycin-Zugabe = 100 % Verringerung von $\Delta\Psi$). Mit 250 μM GTP wurde $\Delta\Psi$ zu 97 % wieder hergestellt, während mit der gleichen Menge GDP nur eine Steigerung von 51 % erzielt wurde, wie aus Tab. 3-4 ersichtlich ist. Mit einer doppelten Mitochondrienmenge sowie Laurinsäurekonzentration stieg $\Delta\Psi$ sogar auf 77 % an. Aus der Tab. 3-4 kann weiterhin entnommen werden, dass mit steigendem pH-Wert von pH 6.5 zu pH 7.1 $\Delta\Psi$ durch Zugabe von Fettsäure sinkt, dagegen durch Purinnucleotide zunimmt. Im Vergleich mit haUCP1 weisen hUCP1-Hefemitochondrien ein sehr ähnliches Membranpotentialverhalten auf. Mit Palmitat als Aktivator der H^+ -Leitfähigkeit wurden die Mitochondrien in ähnlicher Größenordnung wie mit Laurinsäure fast komplett entkoppelt (97 %), ihr Membranpotential konnte aber nur zu 14 % mit GTP wieder hergestellt werden. Palmitinsäure ist eine freie Fettsäure, die wie Laurinsäure zur Aktivierung des H^+ -Transportes durch UCP verwendet werden kann (Gonzalez-Barroso et al., 1996).

Tabelle 3-4

Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$ an Hefemitochondrien mit hUCP1, zu den Zellanzuchtbedingungen siehe Tab. 3-3

Konzentration von hUCP1 [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$]	Zellanzuchtbedingungen	pH-Wert der Messlösung	LA-Konzentration [μM]	Abnahme von $\Delta\Psi$ durch LA [%]	GDP bzw. GTP-Konzentration: 250 μM	Zunahme von $\Delta\Psi$ durch GDP/ GTP [%]
15	B	6.8	50	80	GDP	30
15	B	6.2	50	74	GTP	91
15	B	6.5	50	84	GTP	100
27	B	6.5	50	68	GDP	100
27	B	6.8	50	100	GDP	63
27	B	6.8	50 100	83 100	GDP	77
15	B	6.8	50 (Br-Palmitat)	97	GTP	14
15	C	6.5	50	116	GDP	22
15	C	6.8	50	101	GTP	12
15	D	6.8	50	114	GDP GTP	20 18
15	E	6.8	50	43	GTP	65
15	E	6.8	50 100	96 130	GDP	80
15	E	6.8	50 100	81 128	GTP	51

Durch Änderungen der Zellanzuchtbedingungen wie Aufstufung der Galactose-Induktionsmenge, leicht gesteigerte Schüttelgeschwindigkeit während der Expression (Zellanzuchtbedingungen C) oder Verminderung der Wachstumstemperatur und der Schüttelgeschwindigkeit nach der Galactose-Induktion (Zellanzuchtbedingungen D) wurde die Inhibierung durch GTP sowie auch GDP verschlechtert. Die Zunahme des Membranpotentials durch Zugabe von Purinnucleotiden stieg mit zunehmenden pH-Wert an und entspricht den Ergebnissen der Zellanzuchtbedingungen B. Des weiteren konnte beobachtet werden, dass die Abnahme von $\Delta\Psi$ durch Laurinsäure höher war als durch Valinomycin, was auf eine zusätzliche unspezifische Entkopplung der Mitochondrien durch freie Fettsäuren hindeutet.

Bei Verwendung des SMAT-Mediums für die Hefeanzucht wurde hUCP1 wie unter Kap. 3.1. beschrieben in geringen Mengen exprimiert und die Messung ergab 73 % Entkopplung der Hefemitochondrien durch 50 μM Laurinsäure. Die Zugabe von 100 μM Laurinsäure resultierte in einer um 50 % höheren Entkopplung von 129 % und ist wahrscheinlich wieder auf unspezifische Effekte durch die freien Fettsäuren zurückzuführen. Die Hemmung mit GTP lag etwas niedriger als die, die bei hUCP1-Hefemitochondrien gemessen wurde, die mit Minimalmedium (B) angezogen worden sind. Durch Zugabe von GDP stieg das Membranpotential wieder um 80 % an. Mit dem SMAT-Medium angezogene Hefezellen haben demnach Mitochondrien mit eingebautem hUCP1, deren $\Delta\Psi$ eher durch Purinnucleosiddi- als -triphosphate beeinflusst wird.

Aus den gesamten Ergebnissen lässt sich für die Funktion von hUCP1 darlegen, dass das Protein wie haUCP1 durch Fettsäuren aktiviert wird und eine Verminderung von $\Delta\Psi$ der Hefemitochondrien verursacht. Diese Erniedrigung von $\Delta\Psi$ kann durch GTP bzw. GDP zu einem großen Anteil wieder rückgängig gemacht werden, was auf eine intakte Struktur und den Einbau von hUCP1 in die Hefemitochondrienmembran sowie eine dem haUCP1-Protein entsprechende Funktion hinweist.

3.2.2. Membranpotential von Mitochondrien mit eingebautem hUCP2

Das Plasmid hUCP2 pEMBLyex4 wurde wie unter Kap. 3.1. beschrieben, in *S. cerevisiae* exprimiert und konnte nicht eindeutig in den isolierten Hefemitochondrien nachgewiesen werden. Dementsprechend ergab sich für die in Tab. 3-3 beschriebenen Zellanzuchtbedingungen B zwar eine Veränderung des Membranpotentials von hUCP2-haltigen Mitochondrien durch Laurinsäure, jedoch nicht durch GTP oder GDP. Eine Purinnucleotid-sensitive $\Delta\Psi$ -Änderung konnte nur durch eine erhöhte Fettsäurekonzentration und eine doppelt

so große Mitochondrienmenge gemessen werden. Letzteres führte bei Zugabe von 100 μM Laurinsäure zur Abnahme von $\Delta\Psi$ um 100 % im Verhältnis zu Valinomycin (Verminderung von $\Delta\Psi = 100\%$). Durch 250 μM GDP konnte die Mitochondrienentkopplung wieder zu 14 % aufgehoben werden und durch eine zusätzliche Portion GTP sogar zu insgesamt 42 %. Die Messdaten für hUCP2 sind in der Tabelle 3-5 dargestellt.

Tabelle 3-5

Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$ an Hefemitochondrien mit hUCP2, zu den Zellanzuchtbedingungen siehe Tab. 3-3

Konzentration von hUCP2 [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$]	Zellanzuchtbedingungen	pH-Wert der Messlösung	LA-Konzentration [μM]	Abnahme von $\Delta\Psi$ durch LA [%]	GDP bzw. GTP-Konzentration: 250 μM	Zunahme von $\Delta\Psi$ durch GDP bzw. GTP [%]
15	B	6.8	50	0	GDP	0
15	B	6.8	50	0		
			100	49	GDP	0
27	B	6.8	50	71		
			100	100	GDP GTP	14 28 (gesamt 42)
15	C	6.8	50	120	GTP	26
15	D	6.8	50	97	GTP	13
15	D	6.8	50	108		
			100	125	GDP	10
15	D	6.8	50	5		
			100	58	GTP	9

Durch Steigerung der Galactose-Induktionskonzentration von 2 % auf 3 % und einer leicht erhöhten Schüttelgeschwindigkeit während der Expressionsphase (Zellanzuchtbedingungen C; Tab. 3-3) wurden die hUCP2-Hefemitochondrien mit 50 μM LA um 120 % entkoppelt (siehe hierzu auch Abb. 3-5 unter Kap. 3.2.3.). Diese um 20 % zu hohe Abnahme von $\Delta\Psi$ deutet auf UCP-unspezifische Effekte der Hefemitochondrien hin. Mit GTP konnte $\Delta\Psi$ zu 2% wieder zurückgeführt werden und weist damit auf einen kleinen UCP2-spezifischen Anteil an der $\Delta\Psi$ -Änderung hin.

Eine Verminderung der Zellwachstumstemperatur von 29.5 °C auf 28 °C (Zellanzuchtbedingungen D; Tab. 3-3) führte mit 50 μM Laurinsäure zu einer Abnahme von $\Delta\Psi$ um 70 %. Durch Zusatz von GTP wurde die Entkopplung der Mitochondrien nur zu 13 % wieder aufgehoben. Mit verdoppelter Fettsäurekonzentration verringerte sich das Membranpotential an der hUCP2-haltigen Mitochondrienmembran ähnlich wie bei hUCP1 und haUCP1 auf durchschnittlich 92 % und konnte durch Purinnucleotide nur wenig gehemmt werden.

Die Resultate zeigten, dass hUCP2 das Membranpotential von Hefemitochondrien beeinflussen konnte. Durch die Zugabe von Laurinsäure erfolgte eine Aktivierung des UCP2 in der Mitochondrienmembran. Das so verminderte $\Delta\Psi$ wurde zu einem kleinen Teil sowohl durch GDP als auch durch GTP inhibiert. Dabei war die Hemmung durch GTP höher als die durch GDP. Insgesamt wiesen diese Ergebnisse, trotz des fehlenden direkten immunologischen Nachweises des Proteins in der Mitochondrienmembran, auf einen Einbau von hUCP2 in die innere Mitochondrienmembran hin. Aufgrund des ähnlichen Verhaltens bei den $\Delta\Psi$ -Messungen an Hefemitochondrien lässt sich für hUCP2 eine ähnliche Funktion als Carrier-Protein wie für hUCP1 und haUCP1 vermuten.

3.2.3. Einfluss des Membranpotentials auf Mitochondrien mit eingefügtem hUCP3

Das Plasmid pEMBLyex4-hUCP3 wurde in *S. cerevisiae* in geringen Konzentrationen exprimiert und in sehr geringen Mengen in die Mitochondrienmembran eingebaut, wie unter 3.1. beschrieben. Daher unterlag die Messung des Membranpotentials an isolierten Hefemitochondrien großen Schwankungen und konnte wie aus Tab. 3-6 ersichtlich nur unter bestimmten Zellanzuchtbedingungen (Variante B; Tab. 3-3) ermöglicht werden. Mit 50 μM Laurinsäure wurde für die hUCP3-enthaltenden Mitochondrien im Durchschnitt 25 % Entkopplung erreicht. Durch Zugabe weiterer 50 μM Laurinsäure erhöhte sich die Entkopplung der Mitochondrien auf 59 %, die durch den Einsatz einer doppelten Menge an hUCP3-Hefemitochondrien eine höhere Abnahme von $\Delta\Psi$ (82 %) erzielte. Diese $\Delta\Psi$ -Änderung wurde durch GDP zu 21 % stärker inhibiert als durch GTP zu 12 %, wie auch in Abb. 3-5 dargestellt ist. Mit der größeren hUCP3-Hefemitochondrienmenge sank die Zunahme von $\Delta\Psi$ durch GDP auf 13 % und weist auf einen höheren UCP-unspezifischen Anteil an der Mitochondrienentkopplung durch Laurinsäure hin. Das besagt auch, dass die geringe hUCP3-Synthese nicht die Ursache für die niedrigen Inhibierungsraten durch Purinnucleotide darstellt.

Wenn die Galactose-Konzentration für die Induktion und die Schüttelgeschwindigkeit der Zellkultur während der Expression etwas gesteigert wurden (Variante C; Abb. 3-5), d. h. dass sowohl die Expressionsrate als auch das Zellwachstum zunahmen, erfolgte eine Zunahme von $\Delta\Psi$ um 51 % mit 50 μM LA und um 97 % mit 150 μM LA. Je höher die zugeführte Konzentration an freien Fettsäuren war, um so stärker war auch die Hemmung der $\Delta\Psi$ -Änderung durch GDP. Allerdings treten mit zunehmender Konzentration an freien Fettsäuren auch für UCP unspezifische Effekte auf. Die Zunahme von $\Delta\Psi$ durch GDP entsprach insgesamt den

Werten für die Zellanzuchtvariante B, somit konnten durch die Zellanzuchtbedingungen C keine Vorteile für die hUCP3-spezifischen $\Delta\Psi$ -Änderungen erzielt werden.

Tabelle 3-6

Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$ an Hefemitochondrien mit hUCP3, zu den Zellanzuchtbedingungen siehe Tab. 3-3

Konzentration von hUCP3 [ng μl^{-1}]	Zellanzuchtbedingungen	pH-Wert der Messlösung	LA-Konzentration [μM]	Abnahme von $\Delta\Psi$ durch LA [%]	GDP bzw. GTP-Konzentration: 250 μM	Zunahme von $\Delta\Psi$ durch GDP bzw. GTP [%]
15	B	6.8	50	88	GDP	36
15	B	6.8	50	0		
			100	43	GDP	17
15	B	6.8	50	13		
			100	70	GTP	11
15	B	6.8	50	0		
			100	65	GDP	10
					GTP	12 (gesamt 22)
27	B	6.8	50	28		
			100	82	GDP	13
15	C	6.8	50	99	GDP	10
15	C	6.8	50	2		
			100	45		
			150	97	GDP	24
15	D	6.8	50	37	GTP	0
15	E	6.8	50	0	0	0
15	E	6.8	50	0		
			100	0		
			150	0	GDP	0

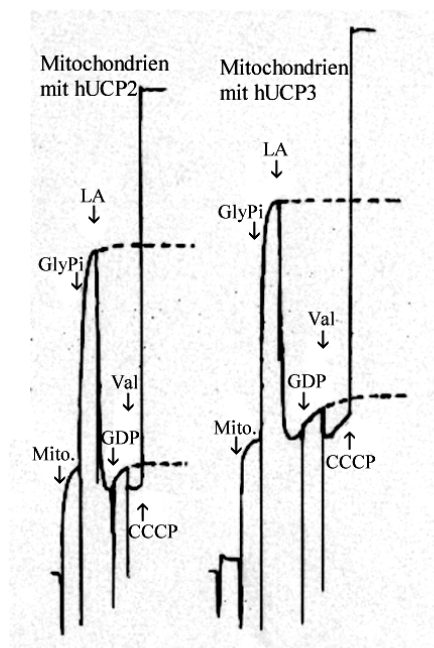


Abbildung 3-5

Membranpotentialmessungen von Mitochondrien mit hUCP2 (pEMBLyex4-hUCP2, Tab. 3-5; Zellanzuchtbedingungen D, Tab. 3-3) und mit hUCP3 (pEMBLyex4-hUCP3, Tab. 3-6; Zellanzuchtbedingungen C, siehe Tab. 3-3)

Eine Verlangsamung des Zellwachstums durch Erniedrigen der Zellwachstumstemperatur (Variante D) oder die Verwendung des SMAT-Mediums (Variante E) anstelle des Minimalmediums, dass ein schnelleres Zellwachstum zur Folge hat, führten zu einer sehr viel geringeren Entkopplung der Mitochondrien, die weder durch GDP noch durch GTP aufgehoben wurde.

Aus den Resultaten lässt sich auf einen stark reduzierten Einbau von hUCP3-Protein in seiner aktiven Konfiguration in die Mitochondrienmembran schließen. Ebenso wie bei den anderen beiden humanen Uncoupling Proteinen hUCP1 und hUCP2 konnte auch das Membranpotential von hUCP3-haltigen Hefemitochondrien durch Laurinsäure entkoppelt und durch GDP oder GTP in sehr geringem Maße wieder aufgehoben werden. Diese Hemmung der $\Delta\Psi$ -Änderung war allerdings für hUCP3 mit GDP etwas stärker ausgeprägt als mit GTP und stellt damit einen Gegensatz zu hUCP1 und hUCP2 dar. Jedoch muss dabei berücksichtigt werden, dass die $\Delta\Psi$ -Änderungen der hUCP3-Hefemitochondrien geringer als die der UCP1 und 2-Hefemitochondrien ausfielen.

3.3. Expression von hUCP in *E. coli*

Für die Expression der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 in *E. coli* wurden die UCP-Inserts in den Expressionsvektor pET24a kloniert. Durch PCR wurden die UCP-cDNAs am 5'-Ende mit einer Nde I-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einer innerhalb der Gensequenz nicht restriktiven Schnittstelle versehen (hUCP1: EcoRI, hUCP2: BamHI, hUCP3: Sall). Das benutzte Expressionssystem basiert auf der Induktion der T7-RNA-Polymerase durch IPTG. Bei dem pET24a-Vektor unterliegt die Transkription der Kontrolle des Bakteriophagen-T7-Promotors. Die einzelnen Plasmide pET24a-UCP wurden in den *E. coli*-Zellstamm BL21(DE3)pLysS transformiert. Dieser Zellstamm enthält die chromosomale Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens des Bakteriophagen λ DE3 unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors sowie das Plasmid lysS, das für die Expression des T7 RNA Polymerase Inhibitors Lysozym verantwortlich ist. Durch die Zugabe von IPTG wurde die T7 RNA-Polymerase expremiert, die an den T7-Promotor des pET24a Vektors bindet und damit die Expression von UCP initiiert. Das pET24a Plasmid hat direkt hinter dem T7-Promotor liegend eine lac-Operator-Sequenz sowie den natürlichen Promotor und die coding-Sequenz für den lac-Repressor (lac1), die so orientiert sind, dass der T7-lac- und der lac1-Promotor voneinander abweichen.

Dadurch wird die Expression der T7-RNA-Polymerase, die in geringen Mengen auch in Abwesenheit von IPTG produziert wird, unterdrückt.

Zur Kontrolle der Expressionsphase wurde das Plasmid ohne UCP-cDNA transformiert. Die Expression wurde bei einer optischen Zelldichte von 0.6 induziert. Da es in der *E. coli*-Zelle keine Mitochondrien gibt, häufte sich das UCP-Protein als Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies, IB) in der Zelle an. Für die hUCPs wurde eine optimale Expression in *E. coli* ermittelt, wie unter 3.3.1. und 3.3.2. dargestellt, die eine maximale Ausbeute an exprimiertem Protein in Form von IB garantiert.

Inclusion Bodies sind intrazelluläre, unlösliche Protein-Aggregate in hochangereicherter Form aus biologisch inaktiven und wahrscheinlich nicht korrekt gefalteten Proteinen. Über die Struktur von IB nimmt man an, dass das überexprimierte Protein eine intermediäre Faltung hat und ähnliche Sekundäreigenschaften wie das native Protein besitzt (Oberg et al., 1994).

IB können sehr einfach durch Zellyse (Lysozym) und anschließende Zentrifugation bei 33000 g isoliert werden. Um eine Kosedimentierung von anderen *E. coli*-Zellfragmenten zu vermeiden, wurde das Lysat beschallt und Triton X-100 zugegeben (siehe 2.2.17.). Die Homogenität des IB-Isolats wurde dann durch eine weitere Waschlösung, die eine geringe Konzentration des Chaotrops Harnstoff enthielt, verbessert. Als geeignetes Detergens für die Solubilisierung heterolog exprimierter mitochondrialer Carrier wurde Sarkosyl (N-Laurylsarcosin Natriumsalz) von Fiermonte et al., (1993) beschrieben. Dieses Detergens erwies sich für die Solubilisierung der IB-UCP ebenfalls als geeignet.

3.3.1. Expression von hUCP2 und hUCP3 in *E. coli*

Zur Expression der humanen UCP2 und 3 wurden beide Plasmide pET24a-hUCP2 und pET24a-hUCP3 nach der unter 2.2.13.2. beschriebenen Methode angezogen. Bei beiden Vektoren war das Wachstum der Zellen im Vergleich zur Kontrolle etwa 1 bis 1.5 h nach der Induktion der Expression stark verlangsamt (Abb. 3-6).

Für hUCP3 wurde die Expressionsdauer in einem Zeitintervall von 45 min bis 285 min variiert und die optimale Expressionsdauer bestimmt, die eine maximale Ausbeute an exprimierten hUCP3 in Form von IB gewährt. Mit zunehmender Zeit stieg zuerst auch der Gehalt an exprimiertem Protein, erreichte aber bei 165 min ein Maximum, danach stagnierte der Wert. Daher wurde für alle hUCP-IB-Produktionen eine Expressionsdauer von 165 min gewählt. Aus den verschiedenen hochkonzentrierten IPTG-Mengen für die Induktion ließ sich

erkennen, dass mit 1 mM IPTG das beste Expressionsergebnis für hUCP3 erzielt wurde (Tab. 3-7). Mit 2 mM IPTG ergab sich keine signifikante Steigerung mehr.

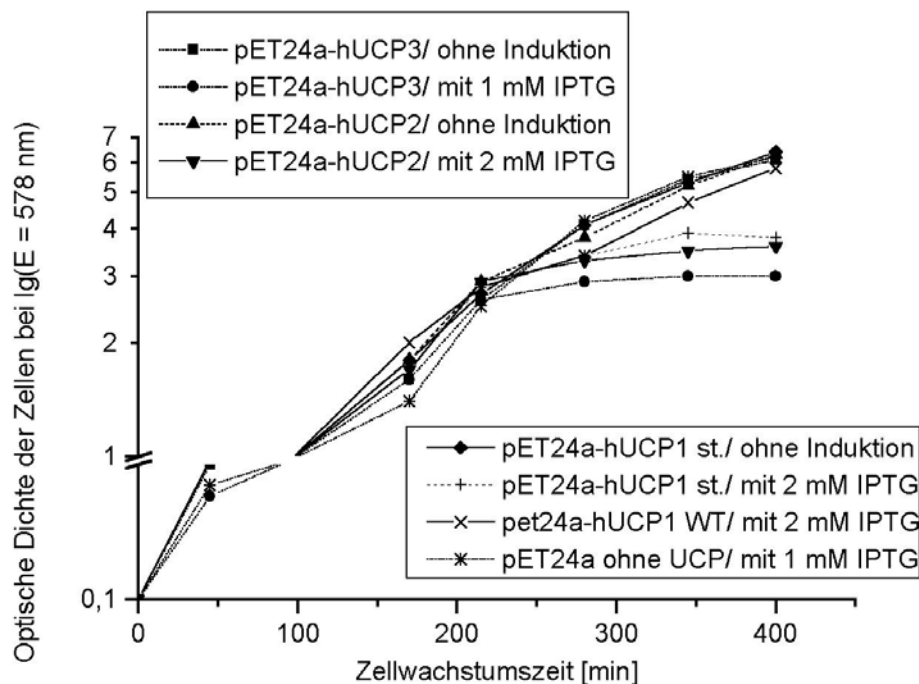


Abbildung 3-6

Wachstumsverhalten von *E. coli* mit den Plasmiden pET24a-hUCP1, -hUCP2, hUCP3 und der Kontrolle pET24a ohne Insert in Abhängigkeit von der IPTG-Induktion

Tabelle 3-7

Expression von hUCP1, hUCP2 und hUCP3 in *E. coli* mit dem Plasmid pET24a in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration. Die Inclusion Bodies wurden aus den Zellen isoliert, aufgereinigt und in Sarcosyl solubilisiert. Messung der Proteinkonzentration nach Lowry. (Kontrolle: Plasmid pET24a ohne Insert)

UCP-Protein	IPTG-Konzentration [mM]	Proteinkonzentration [mg ml ⁻¹]
pET24a (ohne UCP)	1	0
	2	0
hUCP3	0	0
	0.5	30
	1	111
	2	108
hUCP2	0	0
	1	70
	2	92
	4	93
hUCP1-WT1 hUCP1-WT2	2	2.3
	0	0
	1	34
	2	48
	4	51

Für das Plasmid pET24a-hUCP2 hatte das Zellwachstum einen ähnlichen Kurvenverlauf wie für hUCP3 (Abb. 3-6). Aber die Ausbeute an exprimierten IB-Protein war insgesamt niedriger. Daher wurde für die Expression von hUCP2 die IPTG-Konzentration erhöht und mit 2 mM IPTG konnte der Sättigungswert für IB-hUCP2 erreicht werden (Tab. 3-7).

Der Immunoblot in Abb. 3-7 zeigt, dass hUCP2 und hUCP3 in *E. coli* exprimiert werden, während vor der Induktion oder in der Kontrolle kein Protein detektiert werden konnte.

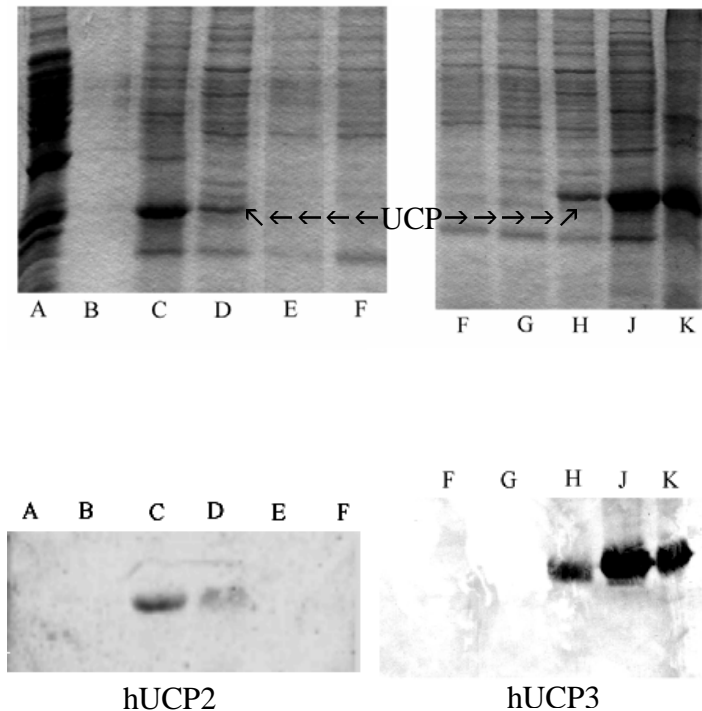


Abbildung 3-7

SDS-Gele (oben) und Immunoblots (unten) von *E. coli* exprimierten IB-hUCP2 (AK hUCP3 B) und IB-hUCP3 (AK hUCP3 A) A) Vergleichsprotein: hUCP2-Mitochondrien aus *S. cerevisiae*, in Triton löslicher Proteinanteil, 100 µg, B) leer; C) IB-hUCP2, mit 2 mM IPTG induziert, 10 µg, renaturiert in Digitonin; D) IB-hUCP2-E.c.-Zellen, 2 mM IPTG-Induktion, 40 µg; E) IB-hUCP2-E.c.-Zellen, 0 mM IPTG-Induktion, 40 µg; F) pET24a ohne Insert-E.c.-Zellen, 2 mM IPTG-Induktion, 40 µg; G) IB-hUCP3-E.c.-Zellen, 0 mM IPTG-Induktion, 40 µg; H) IB-hUCP3-E.c.-Zellen, 1 mM IPTG-Induktion, 40 µg; J) IB-hUCP3, 1 mM IPTG-Induktion, 10 µg; in Digitonin renaturiert, K) Kontrolle: hUCP3-Hefemitochondrien (Heidkämper et al., 2000)

Dabei lag die UCP-Bande (ca. 33 kDa) von hUCP2 etwas niedriger als die von hUCP3. Bei einem Vergleich mit einem Proteinstandard konnte festgestellt werden, dass die hUCP2-Bande zwischen 43 kDa und 29 kDa ungefähr bei 30 bis 32 kDa liegt. Möglicherweise ist die verkürzte Proteinsequenz auf Rückfaltungsprobleme der IB-hUCP2 zurückzuführen, die aufgrund von stärkeren Verunreinigungen durch die geringere Proteinexpression von hUCP2 entstanden sein können. Auch die zunehmende IPTG-Konzentration zur verstärkten hUCP2-Expression erbrachte in diesem Punkt keine Verbesserung.

Aus dem Polyacrylamidgel (Abb. 3-8) ergab sich, dass in den Einschlusskörperchen hUCP2 und hUCP3 als Hauptkomponenten mit einer Reinheit von ca. 70 % und 90 % vorliegen und direkt für die Renaturierung und Transportmessungen verwendet werden können.

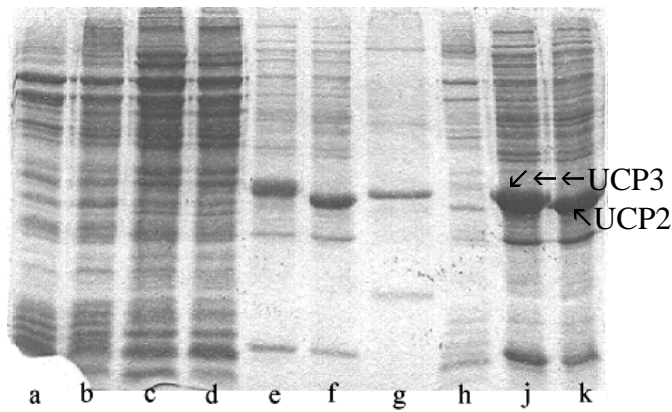


Abbildung 3-8

SDS-Gel von *E. coli* exprimierten IB-hUCP2 (b, d, f, h und k) und IB-hUCP3 (a, c, e und j) mit Inclusion Bodies Reinigung: a, b, c, d und h = abzentrifugierte Verunreinigungen bei der Inclusion Bodies Reinigung (je 5 μ g) e, f, j und k: gereinigte Inclusion Bodies solubilisiert in Sarkosyl-Pufferlösung (Kap. 3.4.); mit e und f = 5 μ g, j und k = 25 μ g. Als Vergleichsprotein diente hUCP3 aus *S. cerevisiae* (7 μ g)

3.3.2. Expression von hUCP1 in *E. coli*

Die Expression von hUCP1 erfolgte wie unter 3.3.1. beschrieben und verlangsamte sich etwa 1.5 h nach der Induktion ein wenig (Abb. 3-6). Nach Aufreinigung der IB ergaben sich nur geringe Proteinkonzentrationen an Sarkosyl-solubilisiertem Protein (Tab. 3-7). Auf dem Coomassie-Blau gefärbten Polyacrylamidgel wurde für IB-hUCP1-WT1 bei ca. 32 kDa eine sehr schwache Bande mit vielen Verunreinigungen gefunden, die sich durch Immunoblot mit Antikörper AK haUCP1 nicht mehr nachweisen ließ (Abb. 3-9, Spur B). Aufgrund der Solubilisierung mit dem stärker ionischen Detergens SDS (8 %) wurde eine sehr breite Bande bei 33 kDa notiert, die aber wegen der Ionenstärke des Detergens nicht mehr mit dem verwendeten Western Blot System immunologisch detektiert werden konnte.

Da das CG/AT-Verhältnis in der Anfangssequenz der hUCP1-cDNA sehr CG-reich war, wurden in den ersten Basenpaaren mittels gezielter Mutagenese die Basen A und T durch mehrere stille Basenaustausche eingeführt, ohne die Proteinsequenz zu beeinflussen,. Das so erzeugte Plasmid pET24a-hUCP1-WT2 wurde wiederum in den *E. coli*-Zellstamm BL21(DE3)pLysS transformiert und unter den bereits genannten Bedingungen angezogen. Mit einer Induktion von 2 mM IPTG wurden hohe Konzentrationen an exprimiertem Protein registriert, die in dem Detergens Sarkosyl solubilisiert wurden, wie unter Kap. 3.4. beschrieben. Eine Verdopplung der IPTG-Konzentration ergab keine ausschlaggebende Verbesserung der Menge an IB-hUCP1-WT2. Für die nachfolgende Renaturierung und Rekonstitution des Proteins wurde deshalb hUCP1-WT2, das aus einer Anzucht mit einer 2 mM IPTG-Induktion stammt, benutzt.

Das SDS-Gel und der Immunoblot in Abb. 3-9 zeigen, dass hUCP1 in *E. coli* auf gleicher Bandenhöhe wie hUCP2 exprimiert wurde, während vor der Induktion oder in der Kontrolle kein Protein detektiert wurde.

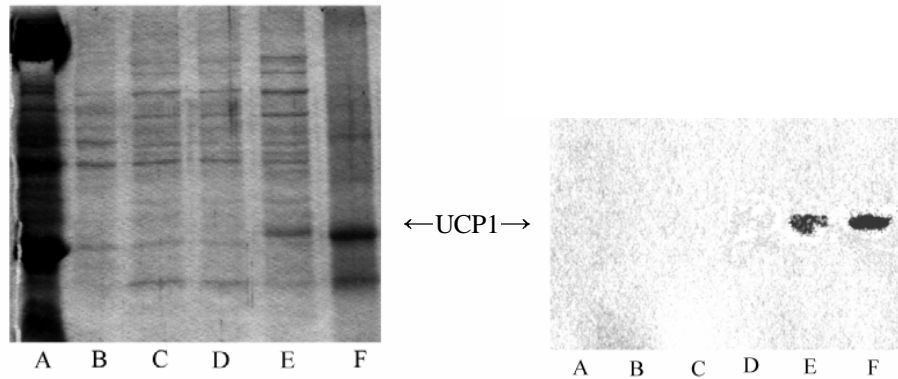


Abbildung 3-9

SDS-Gel und Immunoblot (AK haUCP1) von hUCP1 in *E. coli* exprimiert mit dem Plasmid pET24a: A) IB-hUCP1WT, in SDS solubilisiert, 10 µg, B) IB-hUCP1-WT1, in Sarkosyl solubilisiert, C) pET24a ohne Insert, *E. coli*-Zellen, mit 2 mM IPTG induziert, 40 µg D) IB-hUCP1-WT2 *E. coli*-Zellen ohne IPTG, 40 µg, E) IB-hUCP1-WT2-*E. coli*-Zellen, 2 mM IPTG-Induktion, 40 µg F) IB-hUCP1-WT2, 2 mM IPTG-Induktion, in Sarkosyl solubilisiert.

Aus dem Coomassie-Blau gefärbten Polyacrylamidgel resultiert, dass hUCP1-WT2 als Hauptkomponente mit einer Reinheit von ca. 50 % vorliegt und über eine etwas niedriger liegende Bande als 33 kDa verfügt und auf gleicher Höhe mit der hUCP2-Bande liegt (30 – 32 kDa). Bei hUCP1 könnte die Ursache ähnlich wie bei hUCP2 auf Rückfaltungsprobleme zurückgeführt werden, die möglicherweise durch die größeren Verunreinigung hervorgerufen wurden.

Das SDS-Gel in Abb. 3-10 zeigt die in Sarkosyl solubilisierten Inclusion Bodies von hUCP1, hUCP2 und hUCP3 im Vergleich mit IB-haUCP1.

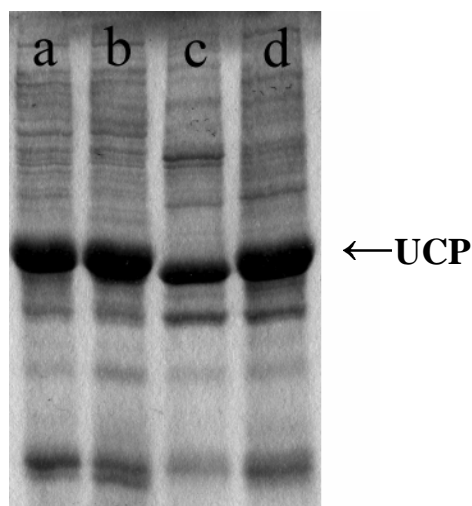


Abbildung 3-10

SDS-Gel mit in Sarkosyl-Pufferlösung (Kap. 2.2.17.) solubilisierten IB von hUCP1 = c (24 µg), hUCP2 = d (32 µg) und hUCP3 = a (27 µg) sowie dem Vergleichsprotein haUCP1 = b (32 µg)

3.4. Renaturierung und Rekonstitution der rekombinanten Uncoupling Proteine aus Inclusion Bodies von *E. coli*

Zur Bestimmung der Transport- und Bindungseigenschaften als Funktionen der UCPs waren geeignete Solubilisierungsmaßnahmen von IB-UCP erforderlich. Das anionische Detergens Sarkosyl (N-Laurylsarcosin Na-Salz) erwies sich für die Solubilisierung der IB-UCP von Vorteil und wurde ähnlich wie für IB-AAC aus *Neurospora Crassa* (Heimpel et. al, 2001) beschrieben, verwendet. Bei Messung der Dansyl-GTP-Bindung an haUCP1 bindete Sarkosyl solubilisiertes IB-haUCP1-Protein keine Nucleotide und Winkler (Echtay et al., 2000) nahmen an, dass entweder mit dem anionischen Detergens keine exakte Rückfaltung des Proteins in seine native Konformation erfolgte oder Sarkosyl die Nucleotidbindungsstellen in UCP besetzt und mit dem zugegebenen Dansyl-GTP konkurriert. Außerdem kann auch der H^+ -Transport durch eine höhere Konzentration von Sarkosyl gestört werden, weil dieses als Fettsäureanalogon die Aktivierung des H^+ -Transportes verhindern kann (siehe hierzu auch Tab. 3-10). Daher wurde durch Dialyse das stärker ionische Detergens Sarkosyl gegen das schwach polare Detergens Digitonin ausgetauscht.

Bei der Dialyse wurde das Volumen der in Sarkosyl solubilisierten Proteinlösung auf 1/3 eingengt und mit 2/3 des 0.1% Digitonin/ Kaliumphosphat-Puffers wieder auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde das Protein mit dem anionischen Austauscherharz Dowex K21 nachbehandelt, um letzte Spuren an solubiliertem Sarkosyl zu entfernen. Dabei wurden 10 bis 30 % UCP-Protein verloren. Mit geringeren zugeführten Volumen an 0.1 % Digitonin/ Kaliumphosphat-Pufferlösung (1.6/ 3 des Gesamtvolumens) und vier Dialyseschritten ergaben sich wesentlich niedrigere Verluste an renaturiertem Protein im Bereich von 0 bis 20 %. Aufgrund der kleineren Volumina bei der Dialyse ist die zugegebene Menge an Digitonin geringer, die Renaturierung verläuft langsamer und wirkt möglicherweise der Aggregation von UCP entgegen. Es könnte auch einen begünstigenden Einfluss auf die Rückfaltung des UCP-Proteins in seine native Konfiguration haben.

Bei der nachfolgenden Behandlung mit Dowex, die in einem Batchversuch durchgeführt wurde, zeigten sich keine weiteren Verluste an renaturiertem Protein. Insgesamt wurden Proteinausbeuten an renaturiertem UCP von 80 bis 100 % erzielt. Alle aggregierten Proteinanteile und kristallisiertes Digitonin wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm nach jedem Renaturierungsschritt abgetrennt. Im SDS-Gel der Abb. 3-11 sind die einzelnen Renaturierungsschritte für IB-hUCP1, -hUCP2 und hUCP3 dargestellt.

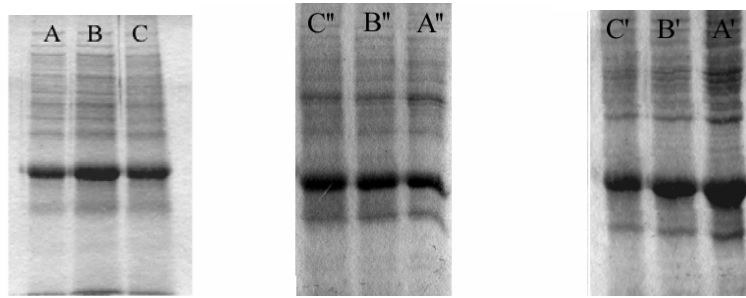


Abbildung 3-11

Renaturierung von IB-UCP mit Sarkosyl solubilisiert (A), nach der Dialyse zum Austausch von Sarkosyl gegen Digitonin (B) und nach der Dowex-Behandlung zur endgültigen Sarkosyl-Entfernung (C); IB-hUCP3: A) 9 µg; B) 17 µg; C) 13 µg; IB-hUCP2: A') 18 µg; B') 13 µg; C') 11 µg, IB-hUCP1: A'') 10 µg; B'') 10 µg; C'') 10 µg Proteinauftrag nach Lowry

Um sicherzustellen, dass sämtliches Sarkosyl aus der UCP-Lösung entfernt worden war, wurde der Dowex-Schritt nach der Rekonstitution des UCP-Lipidvesikels und dessen Pufferaustausch durch Gelfiltration nochmals wiederholt. Wie aus Tabelle 3-10 ersichtlich blieb zwar die H^+ -Transportgeschwindigkeit gleich, aber die Inhibierung durch ADP, die für UCP spezifisch ist, ging stark zurück, so dass für die nachfolgenden Messungen auf eine zusätzliche Dowexbehandlung verzichtet wurde.

Tabelle 3-10

Beeinflussung des Protonentransportes und seiner Inhibierung durch Purinnucleotide (10 µM ADP) durch die Gegenwart des Detergens Sarkosyl am Beispiel von hUCP 3

Detergentien- und Dowex-Behandlungen von UCP	H^+ -Transportgeschwindigkeit v/c [min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein]	Inhibierung des H^+ -Transfers durch ADP [%]
Sarkosyl solubilisiertes UCP	106	10
Digitonin solubilisiertes UCP mit 1 x Dowex-Behandlung	84	57
Digitonin solubilisiertes UCP mit 2 x Dowex-Behandlung (letzte nach der Gelfiltration des Lipidvesikels)	81	33

Zur Messung des H^+ - und Cl^- -Transportes wurden die renaturierten hUCPs in Phospholipidvesikel eingebaut. Dafür wurde die Methode der durch Detergens vermittelten Rekonstitution angewandt. Im Einzelnen bedeutete dies, dass die in Digitonin solubilisierten IB-UCPs in dem nicht-ionischen Detergens $C_{10}E_5$ mit Phospholipid gemischt wurden. Das Detergens/ PC-Verhältnis betrug $D/ PC = 1.4$.

Die Bildung der Vesikel mit eingebautem UCP erfolgte durch Abreicherung des $C_{10}E_5$ mit dem Absorptionsmittel Amberlite. Eine effiziente Entfernung des Detergens von rekonstituierten Proteoliposomen ist unerlässlich, da überschüssiges Detergens sowohl die Protein-

aktivität hemmt, als auch zu einem Anstieg der passiven Permeabilität der Vesikel führt. Auch andere Studien (Rigaud et al., 1995) weisen der anfänglichen Detergenskonzentration eine große Bedeutung für den weiteren Verlauf der Rekonstitution zu. Diese Abhängigkeit und die damit verbundene Häufigkeit der PC-Detergens-Zugabe sowie der Zeitpunkt der Zugabe des Amberlites zu der Proteinlösung ist in Tabelle 3-11 dargestellt.

Durch die zeitverzögerte Amberlite-Zugabe von 10 min nach der PC-Detergens-Zugabe zu der UCP-Lösung ergaben sich für hUCP3 H^+ -Transportgeschwindigkeiten mit besseren Inhibierungen durch ADP als das für die fast zeitgleiche Zugabe von PC/ Detergens und Amberlite der Fall ist. Da die ADP-Hemmung des H^+ -Transportes für UCP spezifisch ist, lässt dies vermuten, dass mit Digitonin solubilisiertes UCP nur ca. 10 min benötigt und mit Phospholipid in $C_{10}E_5$ eine homogene Phase bildet und damit die erste Amberlitezugabe erfolgen kann.

Tabelle 3-11

Die Rekonstitution von UCP in Lipidvesikeln in Abhängigkeit von der Zugabe der PC-Detergens-Lösung und des Amberlites am Beispiel des Protonentransportes von hUCP3 und dessen Inhibierung durch 10 μM ADP

Art der Zugabe der PC-Detergens-Lösung und des Amberlites	H^+-Transportgeschwindigkeit v/c [$\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{Protein}$]	Inhibierung des H^+-Transfers durch ADP [%]
einmalige Zugabe von PC/Detergens, 1 min später Zugabe der ersten Portion Amberlite	73	12
einmalige Zugabe von PC/ Detergens, 10 min später Zugabe der ersten Portion Amberlite	84	57
Zugabe von 1/3 der PC-Detergens-Lösung gleich zur Proteinlösung, die anderen 2 x 1/3 nach jeweils 30 min, Zugabe der 1. Portion Amberlite wie immer 10 min nach Zugabe der ersten 1/3 PC/Detergens-Lösung	87	48

Die PC-Detergens-Zugabe in 3 Anteilen erbrachte keine weitere Verbesserung des mit ADP gehemmten H^+ -Transportes und war auch mit großen Schwankungen bei den Messungen verbunden. Für alle folgenden Rekonstitutionen für die Transportmessungen durch UCP wurde deshalb die PC/ Detergens-Suspension einmalig zur IB-UCP-Lösung gegeben und 10 min später wurde die erste Amberlite-Zugabe getätigt. Der weitere Verlauf der Rekonstitution entsprach dem Protokoll wie unter 2.2.19 aufgeführt. Durch Gelfiltration wurde der Kaliumphosphatpuffer des rekonstituierten IB-UCP-Lipidvesikels gegen einen nicht-ionischen Puffer (HEPES bzw. HEPES/ PIPES) ausgetauscht und die Proteinkonzentration, die in alle Transportberechnungen einfließt, nach Amido-Black bestimmt. In Abb. 3-13 wurden auf einem

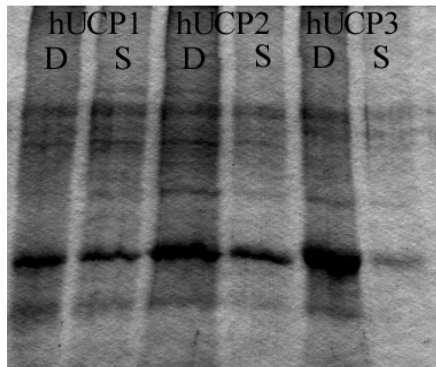


Abbildung 3-12

Extraktion von IB-hUCP1, IB-hUCP2 und IB-hUCP3 aus Phospholipidvesikeln nach Rekonstitution und Gelfiltration. Aufgetragene Proteinmenge für UCP in Sarkosyl solubilisiert (S) oder in Digitonin solubilisiert (D) mit hUCP1 (S) 10 µg und (D) 6 µg, mit hUCP2 (S) 10 µg und (D) 10 µg und mit hUCP3 (S) 5 µg und (D) 10 µg.

SDS-Gel renaturierte und rekonstituierte IB-hUCP1, IB-hUCP2 und IB-hUCP3 nach der Gelfiltration und Extraktion aus den Lipidvesikeln aufgetragen.

3.5. Bestimmung des H^+ -Transportes durch die humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3

Zur Klärung der Funktion von hUCP1, hUCP2 und hUCP3 wurden diese an rekombinanten Protein entsprechend den bekannten Funktionen von haUCP1 getestet. Winkler et al. (1990) hatten an BAT-Mitochondrien einen durch haUCP1 katalysierten Protonentransport ermittelt, der von der cytosolischen Seite zur Matrixseite fließt. Dieser Transport wird durch freie Fettsäuren aktiviert und durch exogene Purinnucleotide gehemmt. Ein weiterer Regulationsfaktor des H^+ -Transfers katalysiert durch UCP ist der pH-Wert. Während UCP1 aus braunem Fettgewebe von Nagetieren isoliert und somit gut funktionell charakterisiert werden konnte war die Isolierung der humanen UCPs wegen ihres niedrigen Gewebegehaltes nicht möglich. Aus diesem Grund und für Mutagenesestudien wurden die rekombinanten UCPs in Hefe und in *E. coli* exprimiert. Das in *S. cerevisiae* exprimierte UCP hat den Vorteil, dass es in die Mitochondrienmembran eingebaut wird und in seiner nativen Konfiguration gefaltet vorliegt. An den humanen in Hefemitochondrien exprimierten UCPs wurden die Transportmessungen ähnlich wie für haUCP1 bestimmt, durchgeführt (Echtay, 1999). Des weiteren wurde zum Nachweis einer Entkopplung das Membranpotential an Hefemitochondrien gemessen, wie unter Kap. 3.2. beschrieben. Dabei zeigten die H^+ -Transportmessungen keine UCP-spezifischen Reaktionen und auch die Membranpotentialmessungen wiesen zwar hohe $\Delta\Psi$ -Änderungen auf, die aber bei den UCP2 und UCP3-haltigen Mitochondrien nur in geringem Maße durch Purinnucleotide gehemmt werden konnten.

Um hohe Konzentrationen an UCP-Protein zu produzieren, wurden die hUCPs ähnlich wie haUCP1 (Echtay et al., 2000) in *E. coli* als I.B. exprimiert, die nach Kap. 3.4. renaturiert und

in Lipidvesikeln rekonstituiert wurden. Dieser Einbau von UCP in die Vesikel ermöglichte zuerst nur einen Cl^- -Transport, jedoch keinen H^+ -Transport, was auf das Fehlen eines Cofaktors oder eine unzureichende Rückfaltung des UCP-Proteins hindeutete. Von der AG Klingenberg (Echtay et al., 2000) wurde in diesem Punkt festgestellt, dass für die Aktivierung des Protonenflusses von UCP1 als weiterer Cofaktor Ubichinon (CoQ_{10}) notwendig ist. Daraufhin konnte für *E. coli* exprimiertes haUCP1 ein H^+ -Transport ermittelt werden, dessen Geschwindigkeit in ähnlicher Größenordnung lag wie beim nativen haUCP1 exprimiert in *S. cerevisiae*. Dieser Cofaktor, CoQ_{10} muss in oxidativer Form zugegen sein und seine maximale Aktivität im molaren Verhältnis zu PC liegt bei 1:300 und zum UCP-Dimer bei 80:1.

In der Abb. 3-13 sind die Messungen des H^+ -Transportes für die humanen IB-UCP1, 2 und 3 sowie dessen Inhibierung durch Purinnucleotide dargestellt. Die Ergebnisse (Abb. 3-13) zeigen, dass durch Zugabe von CoQ_{10} zu rekonstituierten IB-UCP1, IB-UCP2 und IB-UCP3 eine starke Stimulierung des H^+ -Transportes bewirkt wurde. Damit ist Coenzym CoQ_{10} ein obligatorischer Cofaktor für den H^+ -Transport durch die hUCPs, wie teilweise bereits von Echtay et al. (2000) beobachtet wurde. Für alle drei Proteine wurde auch ein Chloridtransport (Kap. 3.6.) und eine Bindung von Dansyl-GTP bzw. -GDP (Kap. 3.7.) in Abwesenheit von Ubichinon gemessen. Als weiterer Cofaktor aktivieren freie Fettsäuren den H^+ -Transport durch IB-hUCPs wie auch bei nativem haUCP1 (Winkler et al., 1994) in und mikromolare Konzentrationen von ATP wirken inhibierend.

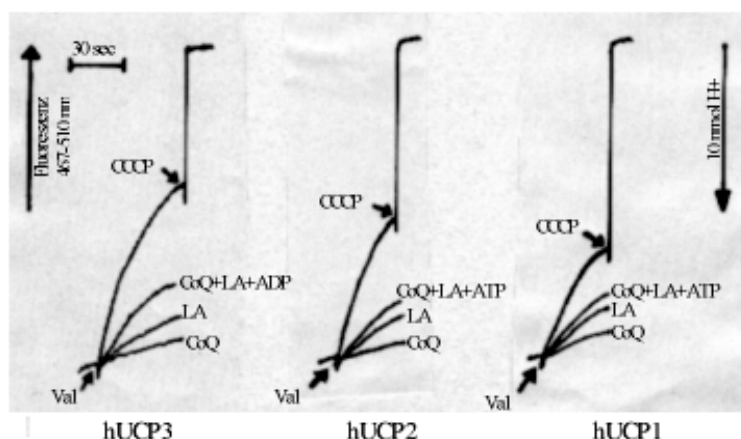


Abbildung 3-13

Aktivierung des H^+ -Transportes in hUCP1, hUCP2 und hUCP3 durch CoQ_{10} .

Aufzeichnung der H^+ -Aufnahme in renaturierte (Digitonin behandelte) und rekonstituierte IB-UCP-Liposomen in Gegenwart von CoQ_{10} ($6 \mu\text{M}$) und Abwesenheit von Laurinsäure, mit Laurinsäure ($125 \mu\text{M}$) und ohne CoQ_{10} sowie mit CoQ_{10} ($6 \mu\text{M}$) plus Laurinsäure ($125 \mu\text{M}$) und schließlich mit CoQ_{10} ($6 \mu\text{M}$) plus Laurinsäure ($125 \mu\text{M}$) plus Inhibitor ADP bzw. ATP ($1 \mu\text{M}$)

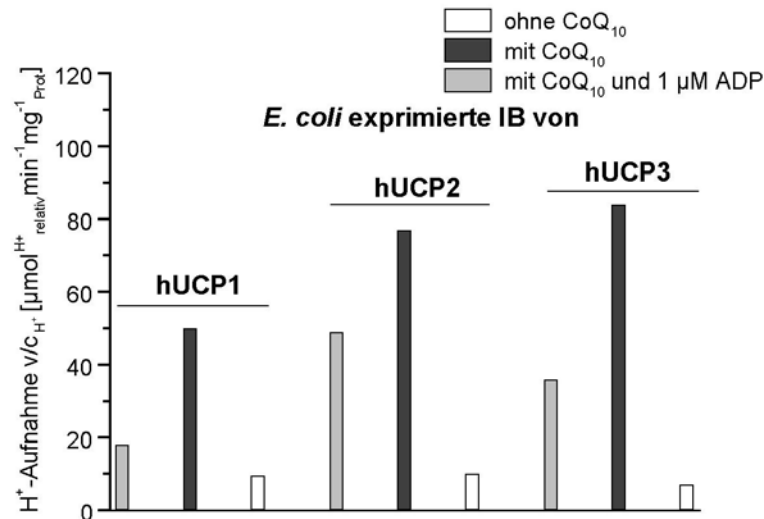


Abbildung 3-14

H^+ -Transportgeschwindigkeiten von hUCP1, 2 und 3 mit LA ohne CoQ₁₀, mit CoQ₁₀ und LA sowie die Inhibierung durch Zusatz von ADP.

Der H^+ -Einstrom wurde über die Änderung des pH-Wertes bestimmt, die durch die Pyranin-Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = 467 \text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$ aufgezeichnet wurde. Eine 50 μl Portion der Vesikel beinhaltete 1.3 μg Protein und 420 μg Phospholipid, die zu 0.5 mM HEPES-Puffer, pH 7.3 mit 1 μM Pyranin, 0.5 mM EDTA und 280 mM Sucrose zu einem Endvolumen von 330 μl bei pH 6.8 und 10 °C hinzugefügt wurden. Valinomycin (Val) mit einer Endkonzentration von 2.5 μM wurde zum Erzeugen eines Membranpotentials in Gegenwart von 125 μM Laurinsäure untergemixt. Die Entkopplung durch 1 μM CCCP wurde durchgeführt zur Bestimmung der Kapazität der H^+ -Leitfähigkeit durch die Vesikel.

Die Ergebnisse stellen die initiierenden (relativen) H^+ -Transportgeschwindigkeiten (v : $\mu\text{mol}_{H^+ \text{ absolut}} \text{ pro min pro mg Protein}$) dividiert durch die Kapazität der Vesikel (C : $\mu\text{mol}_{H^+ \text{ gesamt}}$) dar.

Bei Zugabe von Purinnucleotiden verbleibt ein H^+ -Transport, der nach Echtay et al. (2000) ungefähr dem H^+ -Transport entspricht, der durch Zugabe des Lösungsmittels Dichlormethan ohne Ubiquinon verursacht wird. Daher kann die durch den Cofaktor CoQ₁₀ gesteigerte H^+ -Transportaktivität, die sensitiv gegenüber Nucleotiden ist, als UCP-spezifisch eingeordnet werden. Die H^+ -Transportaktivitäten der IB-hUCPs sind wie aus der Abb.3-14 ersichtlich etwas niedriger als mit nativem haUCP1 (natives haUCP1: $v/c = 120 \mu\text{mol}_{H^+ \text{ relativ}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, Inhibierung mit 100 μM GTP = 85 %; Echtay et al., 1999). Wahrscheinlich unterliegen die *E. coli* exprimierten UCPs einer unterschiedlichen Rückfaltung in die native Konfiguration, die mit zunehmenden Verunreinigungen der IB-UCPs erschwert wurde (siehe hierzu auch Kap. 3.3.)

Um die genaue CoQ₁₀-Konzentration (Lösungsmittel Dichlormethan) für eine optimale H^+ -Transportaktivität durch UCP zu ermitteln, wurden am Beispiel von IB-hUCP2 verschieden hohe CoQ₁₀- und CH₂Cl₂-Mengen getestet, wie in Tabelle 3-12 dargestellt.

Tabelle 3-12

Die Protonengeschwindigkeit von renaturierten und rekonstituierten IB-UCPs in Abhängigkeit von der CoQ₁₀-Konzentration und dem CH₂Cl₂-Lösungsvolumen am Beispiel von IB-hUCP2 und seiner Inhibierung durch 20 µM ATP

CoQ₁₀-Konzentration gelöst in einem Lösungsmittelvolumen des CH₂Cl₂	H⁺-Transportaktivität v/c [µmol_{H+}relativ min⁻¹mg⁻¹Prot]	Inhibierung durch ATP [%]
9,1 µM CoQ ₁₀ , 1,5 µl CH ₂ Cl ₂	21	20
6,0 µM CoQ ₁₀ , 2,0 µl CH ₂ Cl ₂	90	47
5,5 µM CoQ ₁₀ , 1,8 µl CH ₂ Cl ₂	69	55
4,5 µM CoQ ₁₀ , 1,5 µl CH ₂ Cl ₂	49	46
3,0 µM CoQ ₁₀ , 2,0 µl CH ₂ Cl ₂	79	20

Der Cofaktor CoQ₁₀ sollte in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen, da er zum Teil durch das Phospholipid absorbiert wird (Echtay et al., 2000). Dementsprechend wurde mit höheren CoQ₁₀-Konzentrationen gearbeitet und mit 6 µM CoQ₁₀ in 2 µl CH₂Cl₂ die höchste H⁺-Leitfähigkeit mit einer Inhibierung durch 20 µM ATP von fast 50 % erreicht. Mit abnehmendem Lösungsmittelvolumen von 2 auf 1,5 µl sank die H⁺-Transportgeschwindigkeit, wohingegen die CoQ₁₀-Konzentration im Bereich zwischen 4,5 µM und 6 µM am stärksten einen ATP-sensitiven H⁺-Transport erzeugte. Dies bedeutete auch, dass der durch das Dichlormethan verursachte Protonentransport unspezifisch ist.

Für die Messung des H⁺-Transportes wurde der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Pyranin verwendet, dessen Fluoreszenzintensität linear zwischen pH 6.5 und 8.0 ist (Echtay, 1999). Innerhalb dieses Bereiches wurde der pH-Wert am Beispiel von IB-hUCP2 variiert, um seinen optimalen Wert für die Protonentransportaktivität zu ermitteln. Nach Tabelle 3-13 resultiert für pH 7.2 die höchste H⁺-Transportaktivität sowie Inhibierung durch ATP. Durch Inkubation der rekonstituierten IB-hUCP2 mit CoQ₁₀ und Laurinsäure vor Messbeginn (Endkonzentrationen: 100 µM Laurinsäure, 10 µM CoQ₁₀) verminderte sich die Kapazität des Lipidvesikels drastisch. Eine genauere Bestimmung der H⁺-Transportgeschwindigkeit und ihrer Inhibierung war nicht möglich und auf diese Art der Zugabe wurde verzichtet.

Tabelle 3-13

Die H⁺-Transportaktivität von IB-UCPs eingebaut in Lipidvesikel in Abhängigkeit vom pH-Wert des HEPES/ EDTA/ Sucrose-Puffers, der für die fluorometrische Bestimmung der H⁺-Transportgeschwindigkeit durch UCP eingesetzt wurde. Die Inhibierung dieser H⁺-Leitfähigkeit wurde durch Zugabe von 50 µM ATP am Beispiel von IB-hUCP2 durchgeführt.

pH-Wert des Messpuffers	H⁺-Transportaktivität v/c [µmol_{H+}relativ min⁻¹mg⁻¹Prot]	Inhibierung durch ATP [%]
6.75	33	-
6.9	51	14
7.2	116	67
7.4	55	0

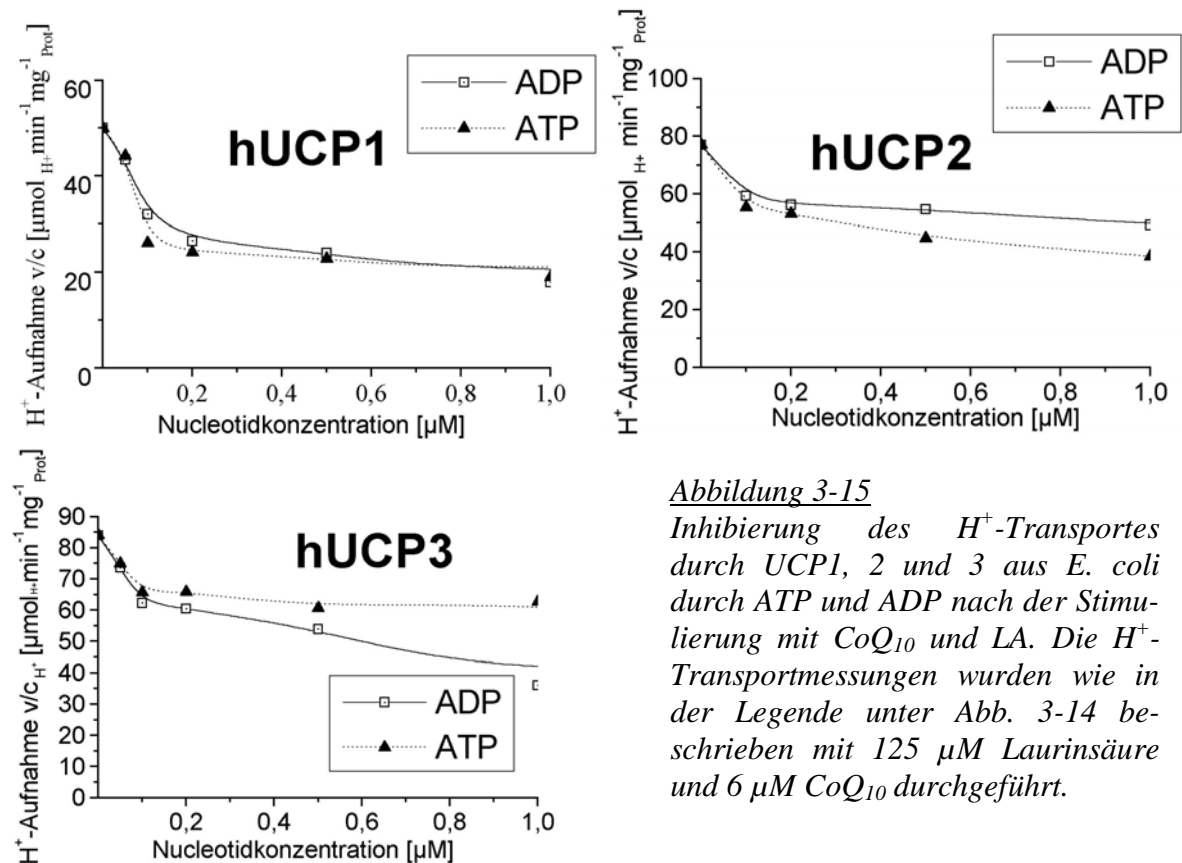


Abbildung 3-15

*Inhibierung des H^+ -Transportes durch UCP1, 2 und 3 aus *E. coli* durch ATP und ADP nach der Stimulierung mit CoQ_{10} und LA. Die H^+ -Transportmessungen wurden wie in der Legende unter Abb. 3-14 beschrieben mit $125 \mu\text{M}$ Laurinsäure und $6 \mu\text{M}$ CoQ_{10} durchgeführt.*

Die Aktivierung des H^+ -Transportes durch CoQ_{10} ermöglichte die Bestimmung der Inhibierungsstärke durch Purinnucleotide, welche das charakteristische Merkmal für UCP darstellt. Unter Zugabe gesättigter Mengen an CoQ_{10} ($6 \mu\text{M}$, 2 nmol) und Laurinsäure ($125 \mu\text{M}$) wurde die Abhängigkeit der Inhibierung von sowohl der ADP- als auch der ATP-Konzentration ermittelt. In Abb. 3-15 sind die drei humanen UCP-Varianten 1, 2 und 3 aufgezeichnet, nach denen sich für IB-hUCP1 ein ähnliches Inhibierungsverhalten des H^+ -Transportes zeigt wie für IB-haUCP1 (Echtay et al., 2000).

Mit $0.1 \mu\text{M}$ Nucleotid liegt die Hemmung durch ADP für hUCP1 bei 36 %, während ATP zu ca. 50 % den H^+ -Transport inhibiert. Mit $1 \mu\text{M}$ ADP als auch ATP resultiert sogar eine Hemmung von $2/3$ der ursprünglich gemessenen H^+ -Leitfähigkeit von hUCP1. Die H^+ -Transportgeschwindigkeit sinkt mit zunehmender Nucleotidkonzentration für ATP schneller als für ADP, ähnlich dem Verlauf bei haUCP1 (70 % Hemmung durch $1 \mu\text{M}$ ADP bzw. ATP; Echtay et al., 2000). Bei hUCP2 steigert sich die Inhibierung des H^+ -Transfers durch Purinnucleotide mit zunehmenden Nucleotidzugaben langsamer als bei hUCP1. Mit $0.1 \mu\text{M}$ ADP sinkt die H^+ -Leitfähigkeit von hUCP2 um 16 % und mit ATP sogar um 28 % und liegt mit $1.0 \mu\text{M}$ Nucleotid bei nur noch 50 % der ursprünglich vorhandenen H^+ -Aktivität, die mit ATP niedriger ist als mit ADP. Das *E. coli* exprimierte hUCP3 weist einen ähnlichen Kurven-

verlauf für die Inhibierung der H^+ -Transportgeschwindigkeit wie hUCP2 auf, jedoch wird hUCP3 durch ADP stärker gehemmt als durch ATP (0.1 μM ADP: 26 % Inhibierung und 0.1 μM ATP: 15 %). Mit 1 μM ADP steigt die Inhibierung des H^+ -Transportes auf fast 60 % an und liegt für 1 μM ATP bei 36 %. Das unterschiedliche Verhalten von hUCP3 im Gegensatz zu hUCP1 und hUCP2 gegenüber Purinnucleosiddi- und -triphosphaten ist interessant und könnte auf eine verschiedene Regulationen der UCPs hindeuten. Bei allen Versuchen zur Inhibierung der H^+ -Transportaktivität von UCP muss berücksichtigt werden, dass die Nucleotidbindungsstelle auf der cytosolischen Seite von UCP liegt. Daher führt revers eingebautes UCP zu keiner Inhibierung des H^+ -Transports. Als weiterer möglicher Grund für einen unspezifischen H^+ -Transport muss die Bildung eines K^+ -Valinomycin-Fettsäureanionkomplexes in Betracht gezogen werden (Winkler und Klingenberg, 1992).

Der H^+ -Transport wird durch Zugabe von Fettsäure initiiert. Nach Abb. 3-16 zeigen alle 3 humanen Uncoupling Proteine mit zunehmender Laurinsäure-Konzentration eine ansteigende H^+ -Transportaktivität, die für hUCP1 und hUCP2 einen S-förmigen Kurvenverlauf aufweist. Dabei liegen die Maxima der H^+ -Leitfähigkeit für hUCP1 und hUCP2 bei ungefähr 125 μM Laurinsäure. Wohingegen bei hUCP3 der H^+ -Transport keine Sättigung bis 150 μM Laurinsäure erreichte sowie der Anstieg der Laurinsäure bis 50 μM LA nicht linear war. Diese Nichtlinearität von hUCP3 ist unerwartet, da in Proteoliposomen mit nativem UCP1 eine lineare Abhängigkeit von der Fettsäure besteht (Winkler et al., 1994). Die geringere H^+ -Transportaktivierung von hUCP1 durch Fettsäure ist wie schon vorher erwähnt wahrscheinlich auf die niedrige Expressionsrate und die damit auftretenden Probleme zurückzuführen.

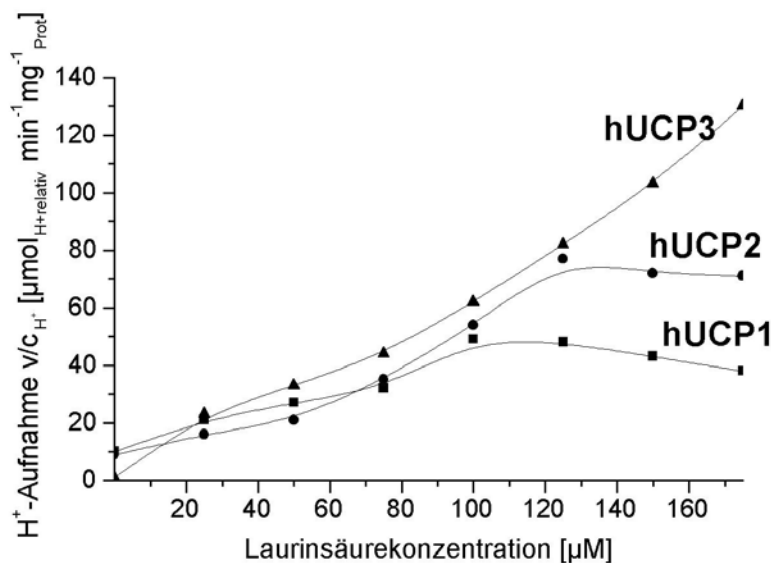


Abbildung 3-16
Abhängigkeit des H^+ -Transportes durch UCP1, 2 und 3 von der Laurinsäurekonzentration. Die Bestimmung der H^+ -Transportaktivität wurde wie in der Legende unter Abb. 3-14 beschrieben mit 6 μM CoQ₁₀ durchgeführt.

Zusammenfassend ist zu den drei humanen Uncoupling Proteine anzumerken, dass sie UCP charakteristische Merkmale aufweisen, d.h. sie besitzen eine H^+ -Transportaktivität, die in Gegenwart des Cofaktors CoQ₁₀ durch Fettsäure initiiert und durch Purinnucleotide inhibiert wird. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass sich alle drei als Inclusion Bodies exprimierte Proteine in ihre nativanaloge Konfiguration zurückgefaltet haben und über eine weitgehend intakte Funktion wie haUCP1 verfügen. Interessant ist dabei, dass UCP3 ein zu UCP1 und UCP2 entgegengesetztes Inhibierungsverhalten des Protonentransportes durch Nucleosiddi- und -triphosphate hat und demnach möglicherweise über eine andere Regulation des Protonentransportes als UCP1 und UCP2 verfügt.

3.6. Ermittlung des Cl^- -Transportes durch hUCP1, 2 und 3

1974 beobachteten Nicholls et al., dass UCP1 auch Chlorid-Transport katalysiert, der aber eine niedrigere Geschwindigkeit als der Protonentransport hat (Jezek und Garlid, 1990, Huang und Klingenberg, 1996). Dieser Cl^- -Transport kann wie der H^+ -Transport durch Purinnucleotide inhibiert werden. Jedoch benötigt der Cl^- -Transport keine Cofaktoren wie Ubichinon und Fettsäure (Echtay et al., 1999). Zur Bestimmung des Cl^- -Transportes durch hUCP1, hUCP2 und hUCP3 wurden die Proteine in *E. coli* exprimiert, die entstandenen IBs wie unter Kap. 3.4. beschrieben, renaturiert und in Lipidvesikeln rekonstituiert. Die Cl^- -Aufnahme in die IB-UCP-Proteoliposomen wurde unter Gebrauch des Anionen-sensitiven Fluorophores mQAE verfolgt. Beim „Quenchen“ der Fluoreszenz von mQAE ist der Verlauf mit Chlorid nichtlinear (Ilsey, Verkman; 1987, Chen et al., 1989, Dunn et al., 1989). Für haUCP1 in Hefe exprimiert wurde von Echtay (1999) eine Quench-Konstante mit $K_{Cl} = 0.15 \text{ mM}^{-1}$ ermittelt. Er stellte weiterhin fest, dass die Lipidvesikel, die durch Diffusion mit mQAE beladen wurden, bei einer Messtemperatur von 10 °C nur einen minimalen Verlust von 0.45 mM min^{-1} an Fluoreszenzquenching haben. Die mQAE-Fluoreszenzverlauf ist für die Messung des Cl^- -Transportes unabhängig im pH-Bereich zwischen pH 6.0 und pH 8.5.

Die Änderung der mQAE-Fluoreszenz in den IB-UCP-Vesikeln wird nach Zusatz von 155 mM KCl (F_i = Startfluoreszenz), das zu einem nach innen gerichteten Cl^- -Gradienten führt, registriert. Nach weiterer Zugabe des Ionophors Valinomycin wird durch den eingeleiteten K^+ -Strom in die Vesikel hinein ein Diffusionspotential erzeugt. Daraus ergibt sich ein Membranpotential mit innen positiver und außen negativer Ladung. Cl^- -Ionen können nur durch UCP zur Neutralisation der positiven K^+ -Ladung fließen. Spezifisch für den UCP geleiteten Cl^- -Transport ist seine Inhibierung durch Purinnucleotide (Abb. 3-17 und 3-18).

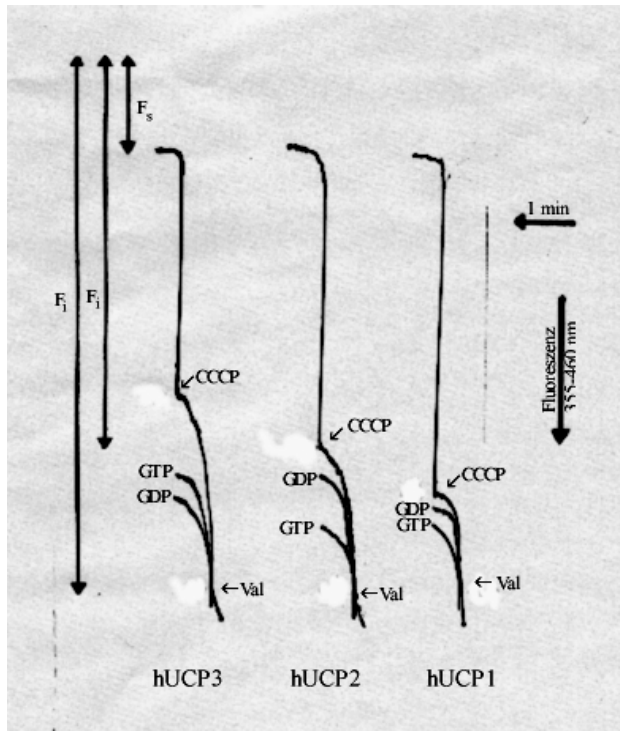


Abbildung 3-17

Cl^- -Einstrom in die Phospholipidvesikel rekonstituiert mit *E. coli* exprimierten hUCP1, hUCP2 und hUCP3. Die Aufnahmen zeigen auch die verschiedenen Inhibierungseffekte der Cl^- -Transportaktivität durch Nucleosiddi- und -triphosphate ($0.5 \mu\text{M}$) zwischen hUCP1, hUCP2 und hUCP3. Der Cl^- -Einstrom wurde durch die Fluoreszenz von mQAE beladenen Vesikeln bei $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ bei pH 6.8 und 10°C gemessen. Eine $50 \mu\text{l}$ Portion der Vesikel wurde in 4 mM Natriumphosphatpuffer mit 155 mM KCl zu einem abschließenden Volumen von $385 \mu\text{l}$ gerührt. Die Cl^- -Einstromgeschwindigkeit wurde nach der Zugabe von $2 \mu\text{M}$ Valinomycin gemessen und Tributylzinnacetat ($40 \mu\text{M}$) zur Äquilibrierung des internen und externen Chlorids hinzugefügt. Die Transportflussgeschwindigkeit wurde aus den Fluoreszenzdaten mittels der unter Kap. 2.2.22 dargestellten Gleichung (9) berechnet.

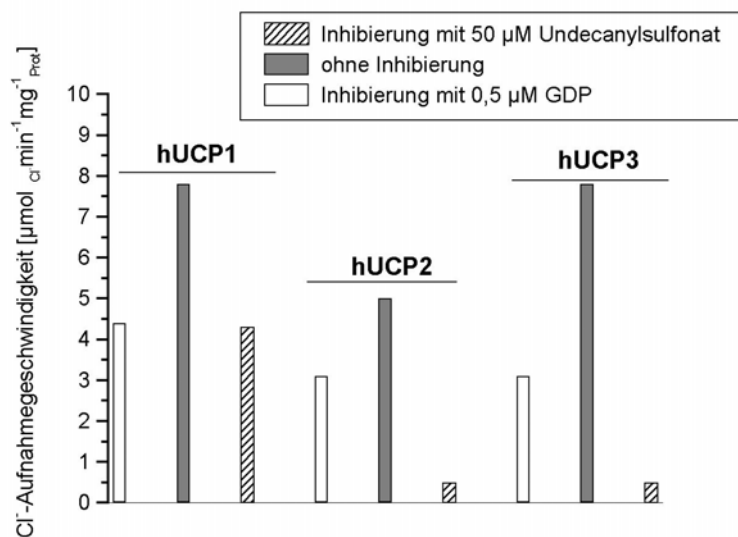


Abbildung 3-18

Chloridtransportaufnahme in die Proteoliposomen, die mit *E. coli* exprimierten IB-hUCP1, IB-hUCP2 bzw. IB-hUCP3 rekonstituiert waren. Für die Bestimmung des Chloridtransports erfolgten die fluorometrischen Messungen wie in der Legende unter Abb.3-17 beschrieben.

Von Echtay et al. (1999) wurde für natives wt-haUCP1 in *S. cerevisiae* exprimiert eine Cl^- Transportaktivität von $J_{\text{Cl}} = 7.0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Prot}$ gemessen, die durch $100 \mu\text{M}$ GTP bzw. GDP zu 80% gehemmt werden konnte. Mit $50 \mu\text{M}$ Undecanylsulfonat wurde eine Inhibierungsrate der Chloridaufnahme von 90% erreicht. Für IB-haUCP1 *E. coli* exprimiert, resultierte eine Cl^- -Transportgeschwindigkeit von $J_{\text{Cl}} = 5.8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Prot}$, die durch $0.5 \mu\text{M}$ GDP zu 45% und durch $0.5 \mu\text{M}$ GTP zu 81% gehemmt wurde (Echtay et al., 1999). Die Cl^- -Transportaktivitäten von rekonstituierten IB-hUCP1, IB-hUCP2 und IB-hUCP3 ($J_{\text{Cl}} = 7.8$

$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}_{\text{Prot}}$ für hUCP1 und hUCP3 sowie $J_{\text{Cl}} = 5.0 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}_{\text{Prot}}$ für hUCP2) sind ähnlich. Hierbei sind Schwankungen bei der Reinheit des für die Vesikel verwendeten PC zu berücksichtigen. Der Chloridtransport mit $J_{\text{Cl}} = 8 \mu\text{mol}_{\text{Cl}} \text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}_{\text{Prot}}$ hat eine sehr viel langsamere Transportgeschwindigkeit als der H^+ -Transport mit $v/c = 80 \mu\text{mol}_{\text{H}^+ \text{spezifisch}} \text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}_{\text{Prot}}$.

Da der Chloridtransport durch UCP auch durch Purinnucleotide gehemmt werden kann, wurde der Verlauf der Inhibierung der Cl^- -Transportaktivität in Abhängigkeit von der zugegebenen GTP- bzw. GDP-Konzentration bestimmt, wie in Abb. 3-19 dargestellt ist.

Für renaturierte und rekonstituierte IB-hUCP1 und IB-hUCP2 ergab sich bis zu einer Nucleotidkonzentration von $5 \mu\text{M}$ eine stärkere Hemmung der Cl^- -Aufnahme durch GTP als durch GDP. Dies entspricht auch dem Inhibierungsverhalten beim Protonentransport von IB-hUCP1 und IB-hUCP2 durch Purinnucleotide. Dagegen wird mit IB-hUCP3 die Cl^- -Transportaktivität mit GDP stärker gehemmt als mit GTP. Dieser Verlauf gleicht der Inhibierung von hUCP3 beim Protonentransport (siehe Kap. 3.5.).

Wahrscheinlich aufgrund der niedrigeren Expressionsraten von *E. coli* exprimierten IB-hUCP1 und IB-hUCP2 gegenüber IB-hUCP3 konnten für hUCP1 und hUCP2 nur mit geringen Nucleotidkonzentrationen bis zu $0.5 \mu\text{M}$ verlässliche Werte für die Hemmung der Cl^- -Transportaktivität ermittelt werden.

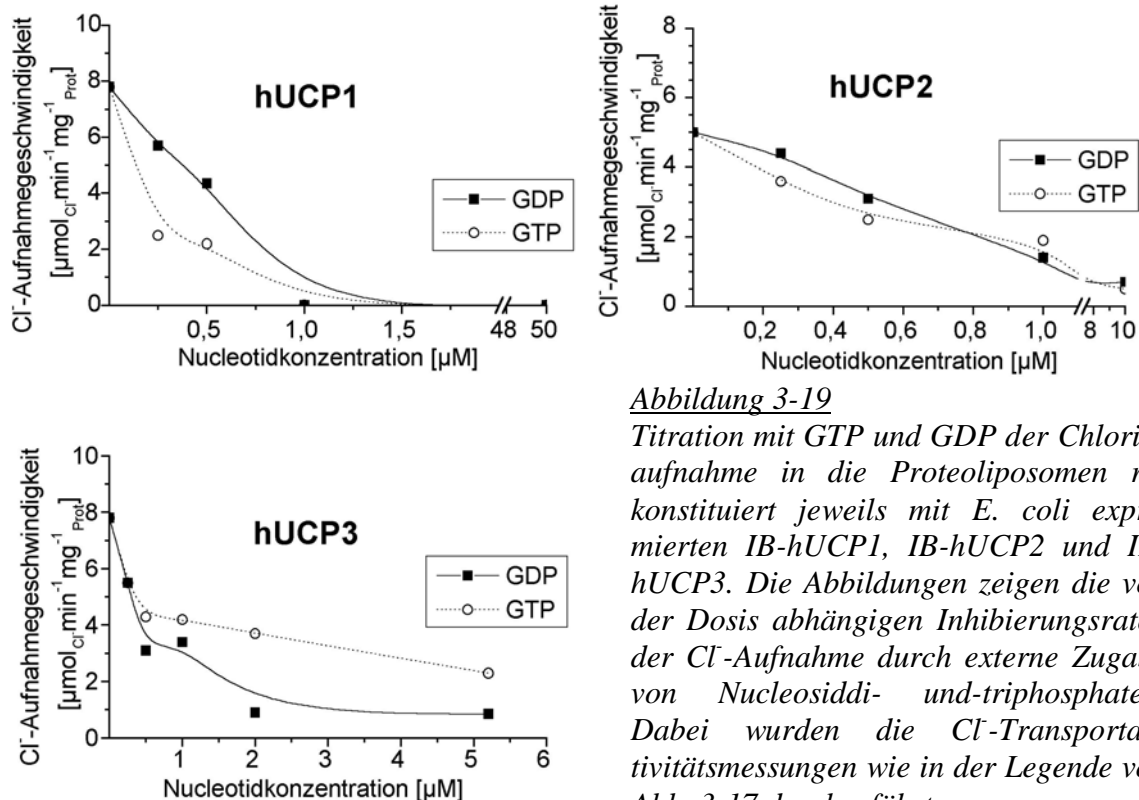


Abbildung 3-19

Titration mit GTP und GDP der Chlorid-aufnahme in die Proteoliposomen rekonstituiert jeweils mit *E. coli* exprimierten IB-hUCP1, IB-hUCP2 und IB-hUCP3. Die Abbildungen zeigen die von der Dosis abhängigen Inhibierungsraten der Cl^- -Aufnahme durch externe Zugabe von Nucleosiddi- und-triphosphaten. Dabei wurden die Cl^- -Transportaktivitätsmessungen wie in der Legende von Abb. 3-17 durchgeführt.

Zusammenfassend ist für hUCP1, 2 und 3 zu nennen, dass alle einen Chlorid-Transport aufweisen, der ähnlich wie der Protonentransport durch Purinnucleotide gehemmt werden kann. Dabei ist das ATP/ADP-Verhältnis für hUCP1, hUCP2 und hUCP3 verschieden hoch.

3.7. Bindung von Dansyl-GTP und Dansyl-GDP an die humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3

ATP ist das dominierende cytosolische Nucleotid und wahrscheinlich der Hauptregulator von UCP 1 in vivo. Auch GTP bindet mit hoher Affinität ausschließlich an UCP und wird gegenüber ATP bevorzugt bei Bindungsmessungen an BAT-Mitochondrien eingesetzt (Rafael und Heldt, 1979). Mit dem fluoreszierenden Derivat DANS-GTP wurde von Huang und Klingenberg (1995a) ein starker Fluoreszenzanstieg bei Wechselwirkung mit Triton solubilisiertem UCP beobachtet. Aus diesem Grund wurden zur Bestimmung der Nucleotidbindung an solubilisierten IB-hUCPs Dansyl-GTP (DANS-GTP) und Dansyl-GDP (DANS-GDP) verwendet. Da sich mit Sarcosyl solubilisiertem UCP keine messbare Bindung ergab, wurde das Detergens gegen das weniger polare Digitonin ausgetauscht und zum Schluss das Protein zur Entfernung des Sarcosyl-Restes mit dem Anionenharz Dowex behandelt. Die Konzentrationsabhängigkeit der DANS-GTP- bzw. DANS-GDP-Bindung an renaturiertem IB-UCP zeigt Abb. 3-20. Die Differenz zwischen der ansteigenden Fluoreszenz und der Fluoreszenz bei im Überschuss zugeführten ATP bzw. ADP ist die spezifische Fluoreszenz ΔF , die sich aus der Bindung an die Nucleotidbindungsstelle von UCP ergibt. Diese Fluoreszenz resultiert aus 1 μmol UCP, gesättigt gebunden mit DANS-GTP bzw. DANS-GDP, entsprechend der Gleichung für die relative Fluoreszenzausbeute $\Phi [\mu\text{M}^{-1}] = \Delta F_{\text{max}} / U_0$ mit ΔF_{max} = maximale Fluoreszenz und U_0 = Anfangskonzentration von UCP. Somit ist diese Bindung B bezogen auf die Fluoreszenzsteigerung durch die Gleichung $B = \Delta F / \Phi [\mu\text{M}]$ gegeben.

Wie aus der Abb. 3-20 ersichtlich konnte für alle drei humanen Uncoupling Proteine eine Nucleotidbindung ermittelt werden, und zwar sowohl mit DANS-GTP als auch DANS-GDP. Die Ergebnisse für die Nucleotidbindungsstärke an hUCP1, 2 und 3 sind in Tab 3-14 aufgeführt.

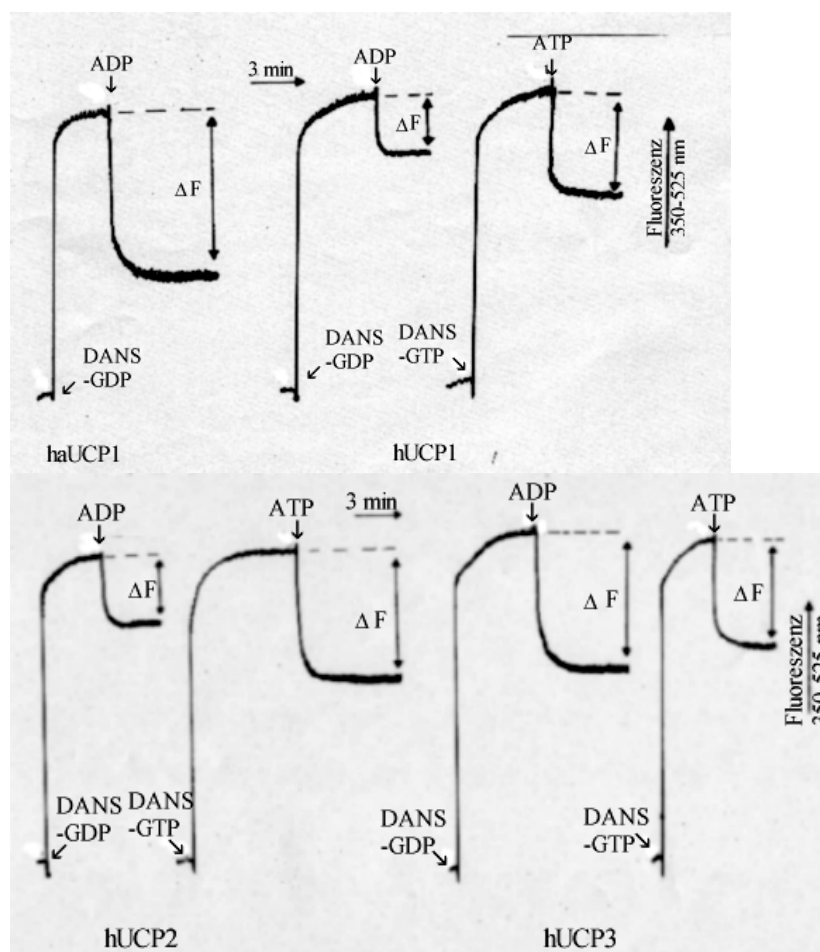


Abbildung 3-20

Fluoreszenzreaktion von [2-O-(Dimethylamino)-naphthalin-1-sulfonyl]-GTP (DANS-GTP)- bzw. GDP (DANS-GDP)-Bindung an Digitonin-behandelte IB-hUCP1, IB-hUCP2 und IB-hUCP3. 5 μ M Dansyl-GTP bzw. -GDP wurden zu einer Lösung von 45 μ g IB-Protein in 10 mM MES/HEPES-Puffer mit 0.3 % Digitonin, pH 6.5 bei 10 °C gemixt (Gesamtvolumen 330 μ l). Zur Abtrennung der UCP-spezifischen Bindungen von unspezifischen Bindungen wurden 0.5 mM ATP hinzugefügt, so dass sich die Fluoreszenzliganden austauschten. Die Fluoreszenz wurde in einem Wellenlängenbereich zwischen λ_{ex} = 350 nm und λ_{em} = 525 nm bestimmt. Die Purinnucleotidbindung der IB-hUCPs wurde im Verhältnis zu den Bindungsstärken des nativen haUCP1 (= 100 %) gesetzt.

Tabelle 3-14


Bindungsstärke von ADP bzw. ATP an *E. coli* exprimierten, Digitonin behandelten IB-hUCP1, 2 und 3 prozentual im Verhältnis zu nativem haUCP1 (= 100 %). Die Daten wurden fluorometrisch mit DANS-GDP bzw. DANS-GTP wie in der Legende von Abb. 3-19 beschrieben ermittelt.

	IB-hUCP1	IB-hUCP2	IB-hUCP3
ADP-Bindungsanteil	25 %	35 %	78 %
ATP-Bindungsanteil	24 %	42 %	51 %

Für hUCP2 und hUCP3 ergeben sich viel höhere Nucleotidbindungen als für hUCP1, das wegen seiner geringeren Expressionsrate stärker verunreinigt und schwieriger zurückzufalten war. Dies könnte zu einem niedrigeren Bindungsanteil geführt haben, als es nativem hUCP1 entsprechen würde. IB-hUCP2 verfügt über einen höheren ATP- als ADP-Bindungsanteil im Gegensatz zu IB-hUCP3, das vorrangig ADP bindet und weniger ATP. Diese Bindung entspricht der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibierung von hUCP2 und hUCP3 durch ADP bzw. ATP. Die Bindung ist auch ein Nachweis für die Rückfaltung der durch *E. coli*-

Expression erzeugten destrukturierten IB-Proteine in eine nativ-analoge Konfiguration. Demnach entspricht die Renaturierung von IB-hUCP3 am ehesten dem in-vivo gefalteten hUCP3, das auch wie unter Kap. 3.3. beschrieben, die höchste Expressionsrate hat.

3.8. Mutagenese

Zur näheren Klärung der Struktur- und Funktionsbeziehungen der humanen Uncoupling Proteine wurden einige gezielte Punktmutationen in der AS-Sequenz vorrangig von hUCP3 eingeführt. Das Wissen der gesamten Proteinsstruktur ist wichtig für das Verstehen des molekularen Mechanismus und seiner Regulation. Zwar sind die primären Strukturen der UCP-Carrierfamilie (AS-Sequenz, cDNA-Sequenz) bekannt, aber der molekulare Mechanismus der H^+ - und Cl^- -Transporte und deren Inhibierungen durch Purinnucleotide bedürfen weiterer Untersuchungen. Auf Grund der großen AS-Sequenzübereinstimmungen zwischen haUCP1 und den hUCP1, 2 und 3 wurden die mutierten Aminosäuren von UCP1 (Echtay et al., und Bienengräber et al., 1999, 2000 und 2001) in die Auswahl möglicher zu mutierender Aminosäuren für UCP2 und UCP3 berücksichtigt. Bei den vorhergehenden Transport- und Bindungsmessungen (Kap. 3.5., 3.6. und 3.7.) wurden mit hUCP1 und hUCP2 ähnliche Ergebnisse wie mit haUCP1 erhalten, deshalb wurden besonders in hUCP3, Mutationen eingeführt. Das humane UCP3 zeichnet sich gegenüber UCP1 und UCP2 durch ein anderes Verhalten bei der Hemmung und Nucleotidbindung aus. In der Proteinstruktur von haUCP1 spielen vor allem geladene Aminosäuren eine bedeutende Rolle für die Funktion (Helicale AS bei der Hemmung und AS der Matrix-Abschnitte beim Transport). Demnach konzentrierte sich die Mutagenese auf geladene Aminosäuren von hUCP3, die entweder in allen UCP-Carriern konserviert sind oder nur in der Isoform hUCP3 vorkommen. Die mutierten AS  sind samt Homologien zu anderen mitochondrialen Carriern in Abb. 3-21 dargestellt.

Helix I

haUCP1 (bp) 15 **hUCP3-D28** 34
haUCP1-----VNPTTSEV-HPTMGV**IF**SAGVAAC**LA****D**IIT**F**PL**D**TAKVRLQIQGEGQ- ---ISSTIR-Y
hUCP1-----MGGLTASDV-HPTLGVQL**FS**AGIAAC**LA****D**VIT**F**PLDTAKVRLQVQGECP- ---TSSVIR-Y
hUCP2-----MVGFKATDV- PPTATVK**FL**GAGTAAC**IA****D**LIT**F**PLDTAKVRLQIQGESQGPVRATASAAQ--Y
hUCP3-----MVGLKSDV-PPTMAVK**FL**GAGTAAC**FA****D**LVT**F**PLDTAKVRLQIQGENQA-VQ-TARLVQ-Y
mUCP2-----MVGFKATDV- PPTATVK**FL**GAGTAAC**IA****D**LIT**F**PLDTAKVRLQIQGESQGLVRTAASAAQ--Y
mUCP3-----MVGLQPSEV-PPTTVVK**FL**GAGTAAC**FA****D**LLT**F**PLDTAKVRLQIQGENPG-AQ---SVQ--Y
AAC MAEQQK-----VLGMPP-FVAD**FL**MGGVSAAV**SK**TAAAP**ER**IKLLVQNQDE--MIRAGRLDRR-Y
PIC-----VVEEQYSCDYGSGRFFILC**GL**GGIISCGT**HT**ALVPLDLVKCRMV--DPQ-----K--Y
KMC-----AATASPGASGMDGKPRTPSKSVK**FL**FGLAGMA**IV**FVQ**PL**DLVKNRMQLSGEGAKT-----RE-Y
CMC--AAPRAPRALTAAPGSGKAKLTHPGK**AI**LAGGLAGG**IE**CIT**F**PTEYVKT-----QLQLDERANPP-----R-Y

Helix II

hUCP3-R94/ hUCP2-R95

75 96
haUCP1 KGVLTITTLA-KTEGLP-KLY**S**GLPAGI-QRQISFAS**L**RIGLY**D**TVQEYFSSG
hUCP1 KGVLTITAVV-KTEGRMKLY**S**GLPAGL-QRQISSAS**L**RIGLYDTVQEFLTAG
hUCP2 RGVMGTILTMV-RTEGPRSL-YN**GL**VAGLQRQMSFAS**VR**IGLYDSVKQFYTKG
hUCP3 RGVLGTILTMV-RTEGPC-SP-YN**GL**VAGLQRQMSFAS**VR**IGLYDSVKQVYTPKG
mUCP2 RGVLGTILTMV-RTEGPR SL-YN**GL**VAGLQRQMSFAS**VR**IGLYDSVKQFYTKG
mUCP3 RGVLGTILTMV-RTEGPR-SP-YS**GL**VAGLHRQMSFAS**VR**IGLYDSVKQFYTPKG
AAC NGIIDCFKRT-ADEGVM-ALWR**GN**TANVIRYFPT**Q**AL**N**FAFRDKFKKMFYK
PIC KSIFNGFSVTL-KEDGFR-GLAK**GW**APTFIGYSLQGL**CK**FGFYEVFKVLYSNMLGE
KMC KTSFHALISIL-RAEGLRGLYT**GL**SAGLLRQATYTT**RL**GIYTVLFERLTGGADG
CMC RGIGDCVRQTVRSHGVL-GLYR**GL**SSLLYGSIPKAA**VR**FGMFEFLSNHMRDAQGR

Helix III

120 134
haUCP1 KETPPTLGNRISAG**IM**TGGVAVLPGQ-----PT**E**VVKVRQAQSHLHGKPR
hUCP1 KETAPSLGSKILAGL**IT**GGVAVFIGQ-----PT**E**VVKVRLQAQSHLHGKPR
hUCP2 KEHASIGSRLLAGS**IT**GALAVAVAQ-----PT**D**VVKVRFQAQARAGGGRR
hUCP3 ADNSSLTRILAGC**IT**GAMAVTCAQ-----PT**D**VVKVRFQASIHGPSRSRDRK
mUCP2 SEHAGIGSRLLAGS**IT**GALAVAVAQ-----PT**D**VVKVRFQAQARAGGGRR
mUCP3 ADHSSVAIRILAGC**IT**GAMAVTCAQ-----PT**D**VVKVRFQAMIRLGTGGERK
AAC KDVDGYWKWMAGN**LA**SGGAAGATSLLFVY**SL**DYARTRLANDAKSAKKGGGERQ
PIC EQAYLWRTSLYLAASASAEFFADIALA----P**ME**AAKVRIQTQPGYANTLRDAAPK
KMC TPGFLLKAVIGMTAGATGAFVGT-----P**A**EVALIRMTADGRLPVDQRRGYK
CMC LDSRRGLLCG**LG**AGVAEAVVVVC-----P**ME**TVKVKFIHDQTSSNPK

Helix IV

	hUCP3 - D164/-E173/ / 174	R187	195
haUCP1	YTGTYNAYRIIATTSFSTLWKG	GTPNLLRNVIINCVEI	VTYDLMKGAL
hUCP1	YTGTYNAYRIIATTEGLTGLWKG	GTPNLMRSVIINCTEL	VTYDLMKEAF
hUCP2	YQSTVNAYKTIAREEGFRGLWKG	TSPNVARNAIVNCAEL	VTYDLIKDAL
hUCP3	YSGTMDAYRTIAREEGVRGLWKG	TLPNIMRNAIVNCAEV	VTYDILKEKL
mUCP2	YQSTVNAYKTIAREEGIRGLWKG	TSPNVARNAIVNCAEL	VTYDLIKDTL
mUCP3	YRGTMDAYRTIAREEGVRGLWKG	TWPNITRNAIVNCAEM	VTYDIIKEKL
AAC	FNGLVDVYRKTIASDGIAGLYR	GFGPSVAGIVVYRGLYFG	LYDSIKPVL
PIC	MYKEEGLKAFYKGVAPLWMR	QIPYTMMKFACFERTVEAL	
KMC	NVFNAIFRIVQEEGVPTLWR	GCIPTMARAVVNAAQL	ASYSQSKQFL
CMC	YRGFIHGVREIVREGLKGT	YQGLTATVLKQGSNQAIRF	FVMTSLRNWY

Helix V

	214	233
haUCP1	VNQILADDVPCHLLSAFVAGFCTTFLASPAD	DVVKTRFINSPLGQY
hUCP1	VKNNILADDVPCHLVLSALIAGFCATAMSSPVD	VVKTRFINSPPGQY
hUCP2	LKANLMTDDLPCHFISAFGAGFCTTVIASPV	DVVKTRYMNSALGQY
hUCP3	LDYHLLTDNFPCHFVSFAFGAGFCATVVASPV	DVVKTRYMNSPPGQY
mUCP2	LKANLMTDDLPCHFISAGAGFCTTVIASPV	DVVKTRYMNSALGQY
mUCP3	LESHLFTDNFPCHFVSFAFGAGFCATVVASPV	DVVKTRYMNAPLGRY
AAC	LVGDLKNNFLASFALGWCTTAAGIASYPLD	TIRRRMMMTSGEAVKY
PIC	YKFVVPKPRSECKPEQLVVTEVAGYIAGVFCAIVSHPAD	DSVSVVLNKEKG
KMC	LDSGYFSDNILCHFCAISMISGLVTTAASMPV	DIVKTRIQNMRMIDGKPEY
CMC	QGDNPKNKPMNPLITGVFGAAGAASVFGNTPLD	VIKTRMQGLEAHKYRNTLD

Helix VI

	268	hUCP3-R281	289
haUCP1	PSVPSCAMTMLTKEGPTAFFKGFVPSFLRL	ASWNVIMFVCFEQLKKELSKSRQTVDCTT	
hUCP1	KSVPNCAMKVFTNEGPTAFFKGLVPSFLRL	GSWNVIMFVCFEQLKRELSKSRQTMDCAT	
hUCP2	SSAGHCALTMLQKEGPRAFYKGFMPFSFLRL	GSWNVVMFVTYEQLKRALMAACTSREAPF	
hUCP3	FSPLCDMIKMVAQEGPTAFYKGFTPSFLRL	GSWNVVMFVTYEQLKRALMKVQMLRESPF	
hUCP2	HSAGHCALTMLRKEGPRAFYKGFMPFSFLRL	GSWNVVMFVTYEQLKRALMAAYQSREAPF	
hUCP3	RSPLHCLMLKMVAQEGPTAFYKGFVPSFLRL	GAWNVMMFVTYEQLKRALMKVQVLRRESPF	
AAC	KSSFDAASQIVAKEGVKSLFKGAGANILRGVAGAGVLSIYD	QLQVLLFGKAFKGGSG	
PIC	SSASEVLKRLGFRGVVWKGLFARIIMIGTLTALQWFIYD	SVKVYFRLRPPPPPEMPESLKKKLGYTQ	
KMC	KNGLDVLVKVVRYEYGFSLWKGFTPYARL	GPHTVLTIFLEQMNKAYKRLFLSG	
CMC	CGVQILKNEGPKAFYKGTVPRLGRVCLDVAIVFVIYD	DEVVKLLNKVWKTD	

Abbildung 3-21

Homologiemerkmale verschiedener Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie: Hamster UCP1 (haUCP1), Human UCP1 (hUCP1), Human UCP2 (hUCP2), Human UCP3 (hUCP3), Maus UCP2 (mUCP2), Maus UCP3 (mUCP3), *Neurospora crassa* ADP/-ATP-Carrier (AAC), Rind Phosphatcarrier (PiC), Rind Ketoglutarat/-Malat-Carrier (KMC), Ratte Citratcarrier (CMC)

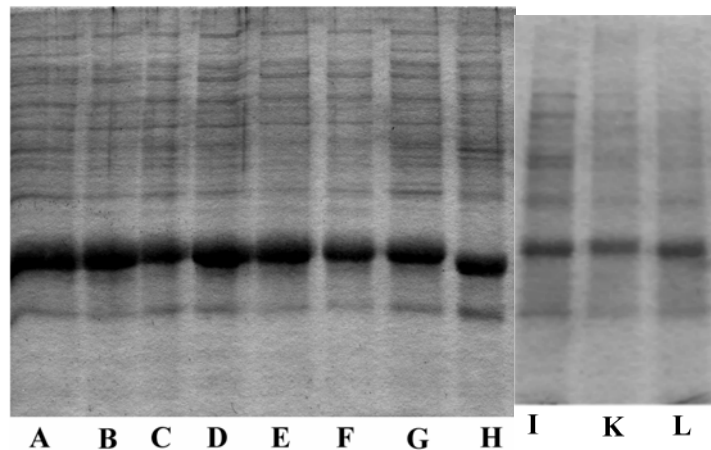


Abbildung 3-22

SDS-Gel mit in Sarcosyl-Pufferlösung solubilisierten IB-hUCP2- und hUCP3-Mutanten (A - H; 10 µg Protein pro Spur) sowie ein Vergleich von Digitonin solubilisierten IB-hUCP3-Mutanten mit wt-IB-hUCP3 (I - L; 5 µg Protein pro Spur)

A) h3-R95T, B) h3-R188Q, C) h3-R282Q, D) h3-D28N, E) h3-E173Q, F) D164N+E173Q, G) D164N, H) h2-R96T, I) h3-wt, K) h3-D28N und L) h3-D164N

Für die Punktmutationen von *E. coli* exprimierten IB-hUCP3 wurde die Methode der gezielten Mutagenese nach Deng und Nickoloff, 1982 ausgewählt (Primersequenzen unter Kap. 2.2.8.). Zur Bestimmung der Transporteigenschaften der mutierten IB-hUCPs wurden die fluorometrischen Messungen, wie für den Wildtyp in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, durchgeführt.

In der Abb. 3-22 wurden die Mutanten von IB-hUCP3 und IB-hUCP2, die in *E. coli* exprimiert und in Sarcosyl-Pufferlösung solubilisiert wurden, auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.8.1. Mutation des intrahelicalen Säurerestes D28 in hUCP3

In der AS-Sequenz aller UCP-Carrier gibt es zwei saure Reste in den transmembranen Helices, und zwar D28 in der ersten Helix und E190 in der vierten Helix, siehe Abb. 3-21. Auf Grund einer möglichen Beteiligung der intrahelicalen Carbonylgruppen am Protonentransport zur Übertragung eines Protons von einer Membranseite zur anderen, könnten diese AS essentiell für die Transportfunktion von hUCP3 sein. Die saure intrahelicale Aminosäure D28, die in allen UCP-Carriern konserviert ist, gilt als Ausnahme zu den anderen Mitgliedern der Carrierfamilie, bei denen an dieser Stelle kaum Säuregruppen auftreten. D28 ist somit spezifisch für UCP. An analoger Position in der transmembranen Helix von Hefe AAC (K38; Müller et al., 1997) führte der Aminosäureaustausch zu starken Verlusten der Transportfunktion. Für haUCP1 wurde von Echtay et al., (2001) für die Neutralisation der D27 von haUCP1 (\equiv D28 in hUCP3) ein drastischen Abfall der H^+ -Transportgeschwindigkeit festgestellt. Daher wurde D28 in hUCP3 neutralisiert und die Expressionsrate der Mutante in *E. coli*, der Protonen- und Chloridtransport samt Inhibierung sowie die DANS-GTP- bzw. –GDP-Bindung wurden im Vergleich zu hUCP3-wt ermittelt (siehe Tab. 3.-15).

Tabelle 3-15

Meßwerte für die Mutante IB-hUCP3-D28N im Vergleich mit dem Wildtyp IB-hUCP3-wt: IB-*E. coli*-Expressionsraten, Rekonstitution in Lipidvesikeln (anfangs eingesetzte Proteinmenge für Einbau = 100 %, Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Amido-Black-Methode), H^+ - und Cl^- -Transportaktivitäten samt Inhibierungen durch Purinnucleotide sowie Purinnucleotidbindungsanteil (100 % = Purinnucleotidbindung an natives haUCP1)

	IB-hUCP3-wt	IB-hUCP3-D28N
Expressionsmenge der gereinigten IB aus <i>E.coli</i> [mg_{IB} ml_{Medium}]	111	96
Einbau von IB-UCP in Lipidvesikeln [%] für H^+-Transport	60	42
H^+-Transportaktivität v/c [$\mu\text{mol}_{H^+} \cdot \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1} \text{Protein}$]	84	31
Inhibierung der H^+-Transportaktivität durch 10 μM ADP [%]	53	42
Einbau von IB-UCP in Lipidvesikeln [%] für Cl^--Transport	52	36
Cl^--Transportaktivität J_{Cl} [$\mu\text{mol}_{Cl^-} \cdot \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1} \text{Protein}$]	7.8	6.5
Inhibierung der Cl^--Transportaktivität durch 10 μM GDP [%]	90	83
Dansyl-GDP-Bindung [%]	78	81
Dansyl-GTP-Bindung [%]	51	43

GDP-Bindung wurden im Vergleich zu hUCP3-wt ermittelt, wie in der Tab. 3-15 dargestellt ist.

Die Mutante IB-hUCP3-D28N (D28N) wurde in ähnlichen Mengen der Wildtyp exprimiert. Dagegen waren die Einbauraten zur Rekonstitution der IB-hUCP3 in Phospholipidvesikeln für D28N um 20 bis fast 50 % niedriger als für den Wildtyp.

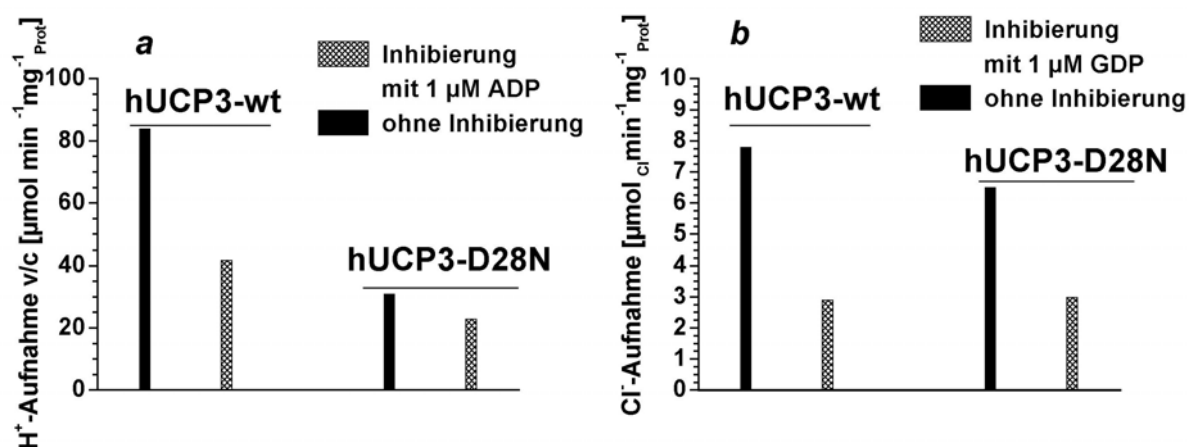


Abbildung 3-23

Protonen- und Chloridtransportaufnahme (a und b) in die Proteoliposomen, die mit *E. coli* exprimierten IB-hUCP3-wt und IB-hUCP3-D28N rekonstituiert waren. Für die Bestimmung des Protonen- und Chloridtransportes erfolgten die fluorometrischen Messungen wie in der Legende unter Abb.3-14 und Abb.3-17 beschrieben.

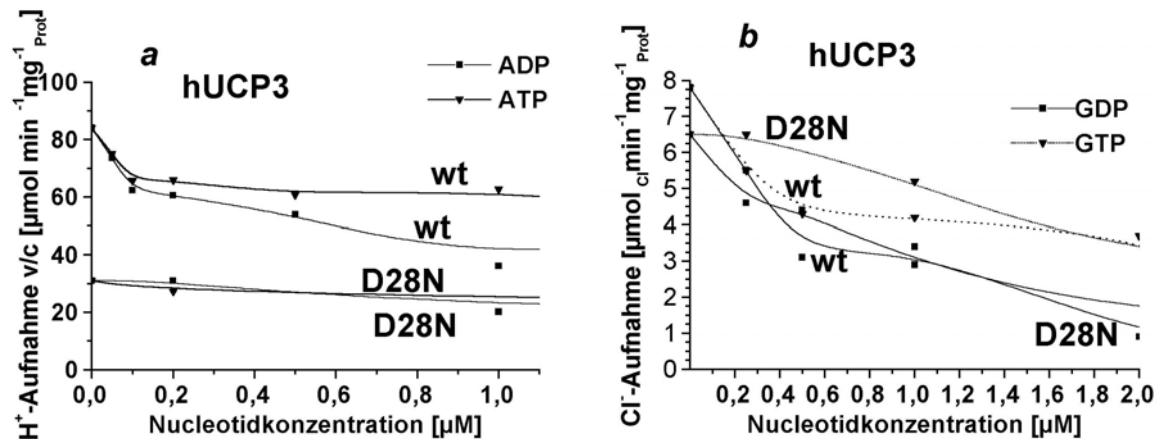


Abbildung 3-24

Inhibition des H^+ -Transportes (a) und Cl^- -Transportes (b) von hUCP3-wt und hUCP3-D28N aus *E. coli* durch Purinnucleotide. Die Protonen- und Chloridtransportmessungen wurden wie in der Legende unter Abb. 3-14 und 3-17 beschrieben durchgeführt.

Interessanterweise wird der Protonentransport durch die Neutralisation von D28 um mehr als 50 % vermindert (siehe Abb. 3-23, a). Das könnte bedeuten, dass die Aminosäure D28 von hUCP3 am H^+ -Transport mitwirkt, möglicherweise wie D27 von *S. cerevisiae* exprimiertem haUCP1. Für die Mutante zeigt sich eine sehr viel geringere Hemmung des Protonentransportes als für hUCP3-wt, die nach Abb. 3-24a für ADP stärker ausfällt als für ATP. Die schwache Hemmung ist wahrscheinlich auf den AS-Austausch zurückzuführen, der bereits zu der starken Erniedrigung der H^+ -Transportaktivität hatte.

Für den Cl^- -Transport sowie die Nucleotidbindung von D28N ergeben sich nach der Tab. 3-14 und der Abb. 3-23b ähnliche Messwerte wie für den Wildtyp (83 % Cl^- -Transportaktivität, 84 % DANS-GTP und 100 % DANS-GDP übrig). Der Chloridtransport wird bei der Mutante D28N wie beim Wildtyp stärker durch GDP als durch GTP gehemmt (Abb. 3-24b).

Daraus schließen wir, dass die Aminosäure D28 weder an der Nucleotidbindung noch an dem Chloridtransport beteiligt ist. Aus den dargestellten Ergebnissen kann wahrscheinlich für die Funktion der Aminosäure D28 eine Beteiligung der Carbonylgruppe am H^+ -Translokationsweg durch hUCP3 angenommen werden.

3.8.2. Mutationen der Säurereste D164, E173 und D164+E173 in hUCP3

In dem hydrophilen ‚Loop‘ auf Matrixseite zwischen der dritten und vierten Helix befinden sich die sauren Aminosäuren D164 und E173. Letztere ist auch in den meisten anderen mitochondrialen Carriern konserviert, wie in Abb. 3-21 dargestellt ist. An dieser Stelle liegt in UCP2 und UCP3 ein doppelter Säurerest, dem wiederum eine positiv geladene Aminosäure vorgelagert ist (hUCP2: R168, E169, E170; hUCP3: R171, E172, E173). Über eine ähnliche

AS-Konstellation verfügen der Phosphatcarrier (K162, E163, E164) und ohne vorgesetzte positive Gruppe der Ketoglutarat/ Malat-Carrier (E173, E174). Beim Phosphatcarrier verdoppelt sich durch Mutation der vorderen sauren Aminosäure E163 die Transportaktivität im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen nach Neutralisation der hinteren Carboxylgruppe E164 nur noch 20 % der Aktivität erhalten bleiben (Phelps et al, 1996). In haUCP1 befindet sich an analoger Position nur eine saure Asparaginsäure E167, die nach Neutralisation von Echta et al. (2000) den Cl^- -Transport fast vollständig unterbindet. Demnach stellt sich die Frage, ob sich die Mutation nur der hinteren AS E173 in hUCP3 in gleichem Maße auf den Chloridtransport auswirken wie bei haUCP1 würde.

In haUCP1 befinden sich in der Nähe von E167 zwei Histidine, die essentiell für den Protonentransport sind (Bienengräber et al., 1998). Demnach könnte E173 von hUCP3, in dessen AS-Sequenz in der entsprechenden Region auch mehrere positive Ladungen vorhanden sind (siehe Abb. 3-21), auch am H^+ -Transport durch UCP beteiligt sein.

Die Asparaginsäure 164 von hUCP3 liegt 10 AS in N-terminaler Richtung vor E173 und ist weder in hUCP1, 2 oder den übrigen mitochondrialen Carriern konserviert, siehe Abb. 3-21. Für die Aminosäure D164 ergeben sich ähnliche Fragestellungen wie für E173, d. h. ein mögliches Mitwirken am Protonen- und/ oder Anionentransport von UCP3. Aufgrundessen wurden die sauren Reste von E173 und D164 neutralisiert (E173Q und D164N) und die Transportfunktionen einschließlich des Purinnucleotidbindungsverhaltens wurden im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Durch Herstellung der Doppelmutanten D163N+E173Q, d. h. Neutralisation der beiden sauren Reste von hUCP3 wurde die Auswirkung auf die Transporteigenschaften und das Bindungsverhalten entsprechend den Messungen bei den Einzelmutanten getestet. Dabei muss eine Beeinträchtigung der Stabilität des Proteins mitberücksichtigt werden, weil nun mögliche Salzbrücken, die sich zwischen den Carboxylgruppen und in der Nähe liegenden kationischen Ladungen bilden könnten, entfallen.

Die Messdaten der Expressionsrate, der Rekonstitutionsstärke, der Transportgeschwindigkeiten sowie des Bindungsverhaltens für die drei in *E. coli* exprimierten und anschließend renaturierten Mutanten D164N, E173Q und D164N+E173Q von IB-hUCP3 sind in der Tabelle 3-16 im Vergleich zu dem Wildtyp aufgeführt.

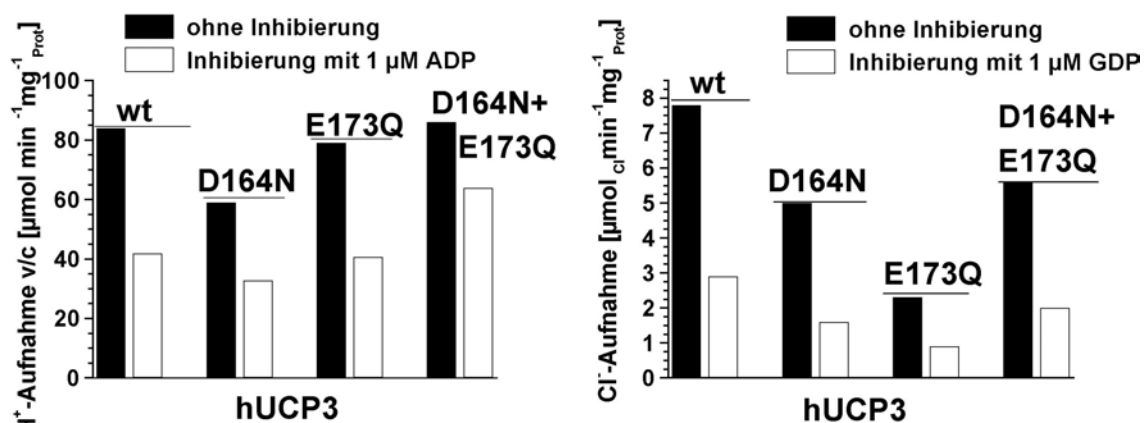
Die Expression von der Mutante IB-hUCP3-E173Q (E173Q) in *E. coli* ergab Proteinmengen in Größenordnung des Wildtyps. Bei der Bestimmung des Protonentransportes (Abb 3-25a) und seiner Inhibierung durch Purinnucleotide (Abb. 3-26) wurde durch die Substitution der Glutaminsäure die H^+ -Transportgeschwindigkeit wenig beeinträchtigt.

Tabelle 3-16

Messwerte für die Mutanten IB-hUCP3-D164N, -E173Q und D164N+E173Q im Vergleich mit dem Wildtyp IB-hUCP3-wt: *E. coli*-Expression, Einbau in Lipidvesikel (eingesetzte Proteinmenge für Einbau = 100 %,) H^+ - und Cl^- -Transportaktivitäten samt Hemmungen durch Purinnucleotide sowie deren Bindungsanteil (100 % = Nucleotidbindung an natives haUCP1)

	IB-hUCP3-wt	IB-hUCP3-D164N	IB-hUCP3-E173Q	IB-hUCP3-D164N+E173Q
Expressionsmenge der gereinigten IB aus <i>E.coli</i> [$mg_{IB} \text{ ml}_{Medium}^{-1}$]	111	93	107	104
Einbau von IB-UCP in Lipidvesikeln [%] für H^+ -Transport	60	28	44	36
H^+ -Transportaktivität v/c [$\mu\text{mol}_{H^+} \text{ spezifisch min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ Protein}$]	84	59	79	86
Inhibierung der H^+ -Transportaktivität durch 10 μM ADP [%]	53	53	56	36
Einbau von IB-UCP in Lipidvesikeln [%] für Cl^- -Transport	52	67	70	56
Cl^- -Transportaktivität J_{Cl} [$\mu\text{mol}_{Cl^-} \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ Protein}$]	7.8	5.0	2.3	5.6
Inhibierung der Cl^- -Transportaktivität durch 10 μM GDP [%]	90	100	100	80
DANS-GDP-Bindung [%]	78	84	62	36
DANS-GTP-Bindung [%]	51	47	57	31

Jedoch erfolgte die Hemmung des H^+ -Transfers bei E173Q schneller als beim Wildtyp. Schon kleine Konzentrationen an Purinnucleotiden (0.2 μM ATP) wirkten bei E173Q (38 % Hemmung) stärker inhibierend auf die Transportaktivität als bei wt (12 % Hemmung), wie in Abb. 3-26 zu sehen ist. Bei höheren Purinnucleotidkonzentrationen resultieren für E173Q gleich hohe Inhibierungsraten beim Protonentransport wie für den wt.

**Abbildung 3-25 a und b**

Protonen (a)- und Chlorid (b)-transportaufnahme in die Proteoliposomen, die mit *E. coli* exprimierten IB-hUCP3-wt, -D164N, -E173Q und D164N+E173Q rekonstituiert waren. Für die Bestimmung des Protonen- und Chloridtransportes erfolgten die fluorometrischen Messungen wie in der Legende unter Abb.3-14 und Abb.3-17 beschrieben.

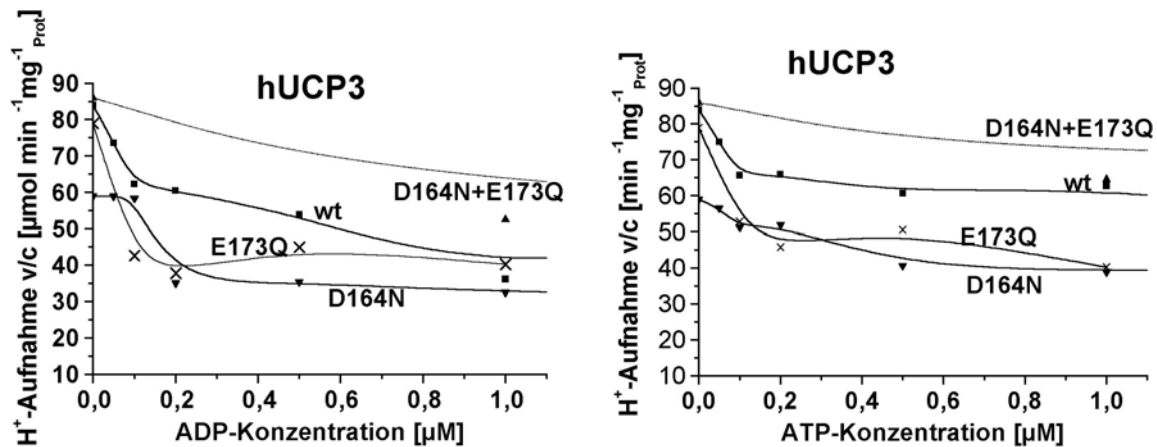


Abbildung 3-26

Inhibition des H^+ -Transportes von hUCP3-wt, hUCP3-D164N, hUCP3-E173Q und hUCP3-D164N+E173Q aus *E. coli* durch ATP (rechts) und ADP (links). Die Protonentransportmessungen wurden wie in der Legende unter Abb. 3-14 beschrieben durchgeführt.

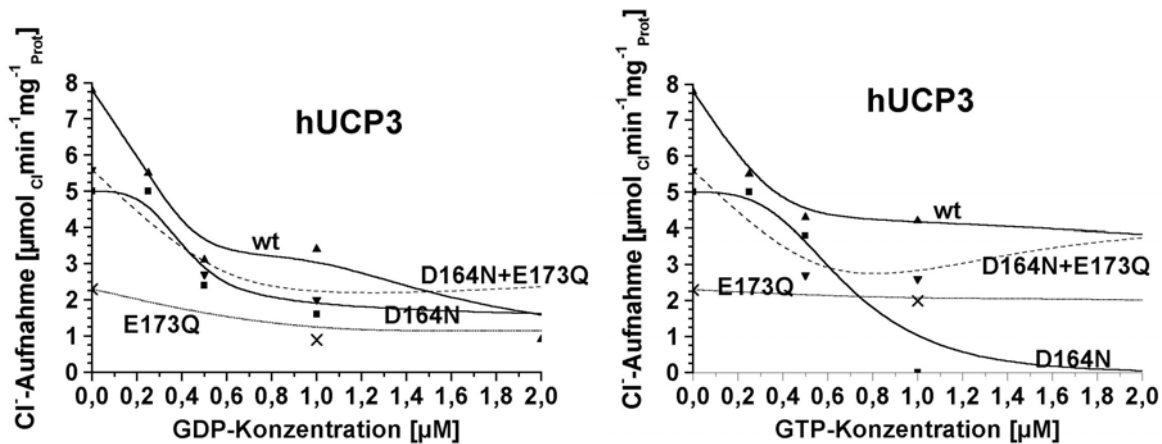


Abbildung 3-27

Titration mit GTP und GDP der Chloridaufnahme in die Proteoliposomen rekonstituiert jeweils mit *E. coli* exprimierten IB-hUCP3-D164N, -E173Q und -D164N+E173Q. Die Abbildungen zeigen die von der Dosis abhängigen Inhibitionsraten der Cl^- -Aufnahme durch externe Zugabe von Nucleosiddi- und -triphosphaten. Dabei wurden die Cl^- -Transportaktivitätsmessungen wie in der Legende von Abb. 3-17 durchgeführt

Bei der Ermittlung des Cl^- -Transportes zeichnet sich für E173Q im Vergleich zu dem Wildtyp ein anderes Bild ab, wie aus der Tab. 3-16 und der Abb. 3-25b zu entnehmen ist. Ähnlich wie bei der Mutanten E167 von haUCP1 ergibt sich für E173Q von hUCP3 ein verminderter Cl^- -Transport. Bei E173Q von hUCP3 bleiben nur 30 % der Cl^- Transportaktivität erhalten (Bei der in *S. cerevisiae* exprimierten Mutante haUCP1-E167Q sind 8 % der Cl^- -Aktivität übrig; Echtay et al., 2000). Die verbleibenden 30 % Cl^- -Transportaktivität in der hUCP3-Mutante sind möglicherweise auf eine Beteiligung der vor E173 befindlichen sauren AS E172 zurückzuführen. Durch die Zugabe von Purinnucleotiden (GDP, GTP) wurde erst bei höheren Konzentrationen eine weitere Verminderung der Cl^- -Transportgeschwindigkeit erzeugt (Abb. 3-27) und wird mit 10 μM GDP völlig unterbunden (siehe Tab. 3-16).

Mit DANS-GTP- bzw. -GDP-Bindung wurde an E173Q ähnliche Bindungen wie am Wildtyp gemessen. Das bedeutet, dass die Neutralisation des sauren Restes E173 keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von UCP3 hat.

Durch die Neutralisation der sauren Asparaginsäure D164 zu Asparagin (D164N) blieb die Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp weitestgehend konstant, wie aus der Tab. 3-16 zu erkennen ist. Die Protonentransportgeschwindigkeit von D164N ist um 30 % vermindert (Abb. 3-25a). Dabei sind die geringere Expressionsrate und die niedrigeren Einbauraten in die Lipidvesikel für den H^+ -Transport mitzuberücksichtigen, die möglicherweise auf eine leichte Instabilität des mutierten UCP3-Proteins hinweisen. Die Inhibierung der H^+ -Transportleitfähigkeit durch Purinnucleotide weist für die Mutante eine ähnliche Abnahme auf wie für den wt.

Ähnlich wird der Cl^- -Transport durch die Neutralisation der Carboxylgruppe von D164 um 36 % vermindert (Abb. 3-25b). Dabei ist zu beachten, dass die Rekonstitution in Lipidvesikel für den Chloridtransport bei der Mutante D164N ähnliche Einbauraten aufweist. Die Inhibierung der Cl^- -Transportleitfähigkeit durch Purinnucleotide (GDP, GTP) zeichnet sich für D164N durch einen ähnlichen Kurvenverlauf wie der wt aus, wie aus der Abb. 3-27 ersichtlich ist. Hierbei wurden nur niedrige GDP- bzw. GTP-Konzentrationen beurteilt, da bei höheren zugegebenen Dosen an Purinnucleotiden der zu vermessende D164N-Lipidvesikel instabil wurde. Aus den Bindungsmessdaten mit DANS-GDP bzw. -GTP ergeben sich ähnliche Werte wie für den wt.

Daraus folgt für die Substitution der Asparaginsäure D164 von hUCP3, dass möglicherweise eine Beteiligung an dem Protonen- als auch an dem Anionentransport vorliegt, aber keinerlei Beeinflussung der Purinnucleotidbindung an UCP3 sowie der Hemmung der Transportfunktionen von UCP3 durch Purinnucleotide. Andererseits kann der Säurerest auch an der Stabilisierung der hUCP3-Proteinstruktur beteiligt sein, ähnlich der AS D28 (Kap. 3.8.1.)

Mit der Doppelmutanten D164N+E173Q sollte festgestellt werden, ob sich die Effekte der Einzelmutationen auf die Transportfunktionen, insbesondere der von E173Q auf den Chloridtransport verstärken (siehe hierzu Tab. 3-16, Abb. 3-25a+b, 3-26 und 3-27). Dabei war zu berücksichtigen, dass durch die Mutation zweier saurer Reste die Rückfaltung und damit die Stabilität des UCP3-Proteins gefährdet werden konnten. Wider Erwarten war die Expressionsmenge, der Protonentransport und der Chloridtransport samt seiner Inhibierung durch Purinnucleotide ähnlich dem Wildtyp. Obwohl mit der Einzelmutation von E173 der Anionentransport stark verringert war. Die Bindungsmessungen mit DANS-GDP bzw. -GTP

sowie die Inhibierungsmessungen des Protonentransportes durch Purinnucleotide wiesen bei der Doppelmutanten keinen UCP-spezifischen Verlauf auf und lagen zu über 50 % unter den wt-Ergebnissen. Demnach könnte D164N+E173Q aufgrund des Fehlens zweier saurer Reste nicht in der nativ-analogen UCP-Konfiguration vorliegen.

3.8.3. Mutationen der intrahelicalen Arginine R95, R188 und R282 in hUCP3

In allen Mitgliedern der UCP-Carrierfamilie befinden sich 5 positiv geladene Aminosäuren in den 6 transmembranen Helices, 4 Arginine und ein Histidin. Die vier Arginine kommen immer in der zweiten Helix der drei Domänen in UCP vor und sind innerhalb einer bestimmten Variabilität typisch für mitochondriale Carrier (Nelson et al., 1996). Für hUCP3 liegen R87 und R95 in der zweiten Helix der ersten Domäne, R188 in der vierten Helix der zweiten Domäne und H220 in der 5. und R282 in der 6. Helix der dritten Domäne (Abb. 3-21). Durch Neutralisation der positiven Reste wird z. B. die Funktion des Hefe ADP/ATP-Carriers drastisch inhibiert (Müller et al., 1996). Dabei wird durch die Mutation der Arginine in der 2. und 4. Helix des AAC der ADP/ATP-Transport völlig gehemmt, wohingegen die Substitution von R294 in der 6. Helix wenig Einfluß auf die Austauschrate hat (Heidkämper et al., 1996). In UCP1 wurden die Arg-Reste sowohl von der Gruppe Klingenberg (Echtay et al., 2000) als auch von der Gruppe Garlid (Murdza-Inglis et al., 1994, Modriansky et al., 1997) mutiert. Beide stellten fest, dass der H^+ -Transport insensitiv gegenüber Nucleotiden bei drei der vier mutierten Arginine wurde, und zwar bei R83, R94 und R182 und auch die Nucleotidbindung an UCP1 in R83 als auch R182 beeinträchtigt war. Echtay et al. (2001) hatten bei der Neutralisation von R91 eine pH-abhängige schwächere Inhibierung des H^+ -Transportes durch Nucleotide sowie eine drastische Verminderung des Anionentransportes durch UCP1 ohne irgendeinen Einfluss auf den H^+ -Transport beobachtet. Um eine analog zu UCP1 vorliegende Beteiligung der Arginine an der Bindung der stark negativ geladenen Nucleotide oder an den Transportfunktionen von UCP3 zu entdecken, wurden die basischen Reste der Arginine R95 (R95T), R188 (R188Q) und R282 (R282Q) in hUCP3 neutralisiert, siehe auch Abb. 3-21.

In der Tabelle 3-17 wurden die Messdaten für die Expressionsrate, die Proteineinbauraten in die Lipidvesikel, die Transportgeschwindigkeiten samt Inhibierungen und das Purinnucleotidbindungsverhalten aufgelistet. Aus der Tab. 3-17 und der Abb. 3-28a ist zu entnehmen, dass die exprimierte Proteinmenge sowie der Protonentransport trotz der Mutationen erhalten bleibt.

Tabelle 3-17

Messwerte für die Mutanten IB-hUCP3-R95T, -R188Q und R282Q im Vergleich mit dem Wildtyp IB-hUCP3-wt: IB-E. coli-Expressionsraten, Rekonstitution in Lipidvesikeln (eingesetzte Proteinmenge für Einbau = 100 %, Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Amido-Black-Methode), H^+ - und Cl^- -Transportaktivitäten samt Inhibierungen durch Purinnucleotide sowie Purinnucleotidbindungsanteil (100 % = Purinnucleotidbindung an natives haUCP1)

	hUCP3-wt	hUCP3-R95T	hUCP3-R188Q	hUCP3-R282Q
Expressionsmenge der gereinigten IB aus E.coli [$mg_{IB} \text{ ml}_{Medium}$]	111	108	112	129
Einbau von UCP in Lipidvesikeln [%] für H^+-Transport	60	48	41	32
H^+-Transportaktivität v/c [$\mu mol_{H^+} \text{ relativ} \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ Protein}$]	84	86	77	73
Inhibierung der H^+-Transportaktivität durch 10 μM ADP [%]	53	59	20	0
Einbau von UCP in Lipidvesikeln [%] für Cl^--Transport	52	42	18	16
Cl^--Transportaktivität J_{Cl^-} [$\mu mol_{Cl^-} \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ Protein}$]	7.8	2.9	3.5	4.1
Inhibierung der Cl^--Transportaktivität durch 10 μM GDP [%]	90	100	100	100
Dansyl-GDP-Bindung [%]	78	65	44	25
Dansyl-GTP-Bindung [%]	51	59	35	21

Demnach haben die drei intrahelicalen Arginine keine Bedeutung für die H^+ -Transportgeschwindigkeit. Jedoch haben die Mutanten R188Q und R282Q ein anderes Verhalten gegenüber Purinnucleotiden als der Wildtyp und R95T (Tab. 3-17, Abb. 3-28a, 3-29). Demnach ist R95, das nur in der UCP-Carrierfamilie vorkommt, weder für die Nucleotidbindung an UCP3 noch für die Inhibierung des H^+ -Transportes durch Nucleotide von besonderer Wichtigkeit. Im Kontrast dazu stehen die hUCP3-Mutationen R188Q und R282Q, bei denen der H^+ -Transport fast unempfindlich gegenüber Purinnucleotiden ist.

Für R95T wurde nach Abb. 3-29 eine Inhibierung der H^+ -Transportleitfähigkeit von 40 % (ATP) bis 45 % (ADP) beobachtet. Dabei ist die Differenz bei der Hemmung durch hohe Nucleosiddi- und triphosphatkonzentrationen niedriger (R95T ca. 5 %) als bei wt (ca. 20 %).

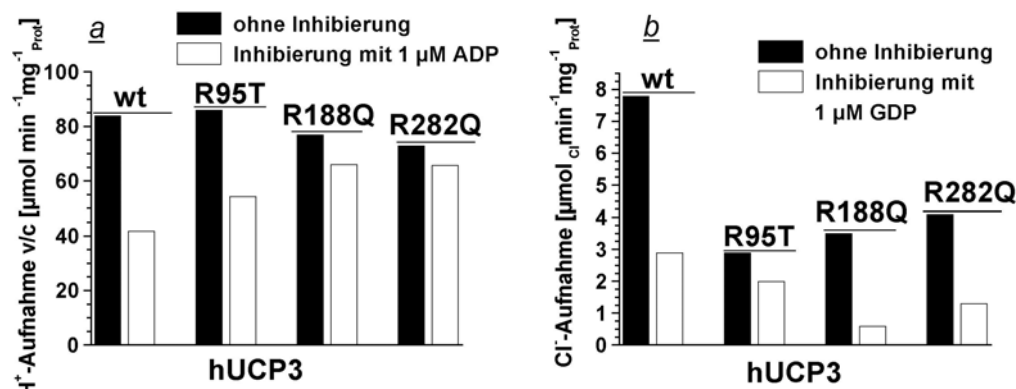


Abbildung 3-28 a und b

Protonen (a)- und Chlorid (b)-transportaufnahme in die Proteoliposomen, die mit *E. coli* exprimierten hUCP3-wt -R95T, -R188Q und -R282Q rekonstituiert waren. Für die Bestimmung des Protonen- und Chloridtransportes erfolgten die fluorometrischen Messungen wie in der Legende unter Abb.3-14 und Abb.3-17 beschrieben.

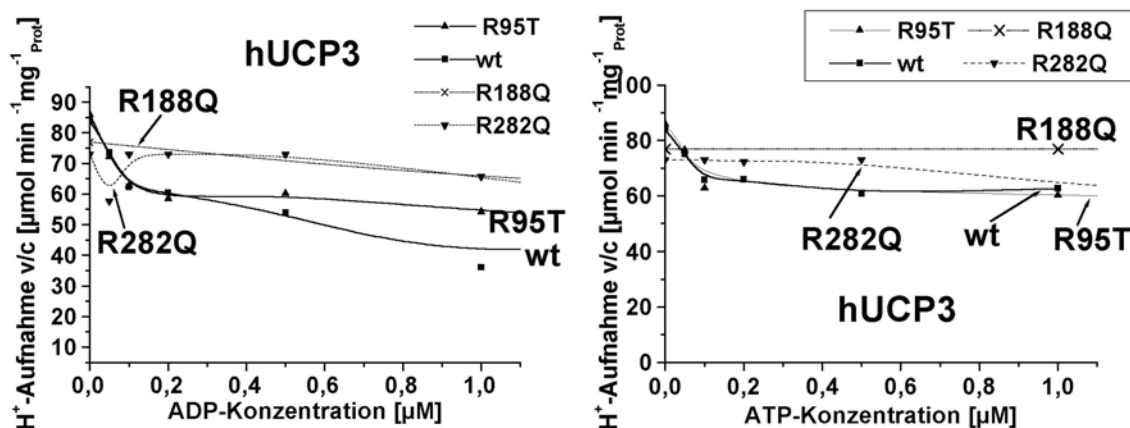


Abbildung 3-29

Inhibierung des H⁺-Transportes von hUCP3-wt, hUCP3-R95T, hUCP3-R188Q und hUCP3-R282Q durch ATP (rechts) und ADP (links). Die Protonentransportmessungen wurden wie in der Legende unter Abb. 3-14 beschrieben durchgeführt.

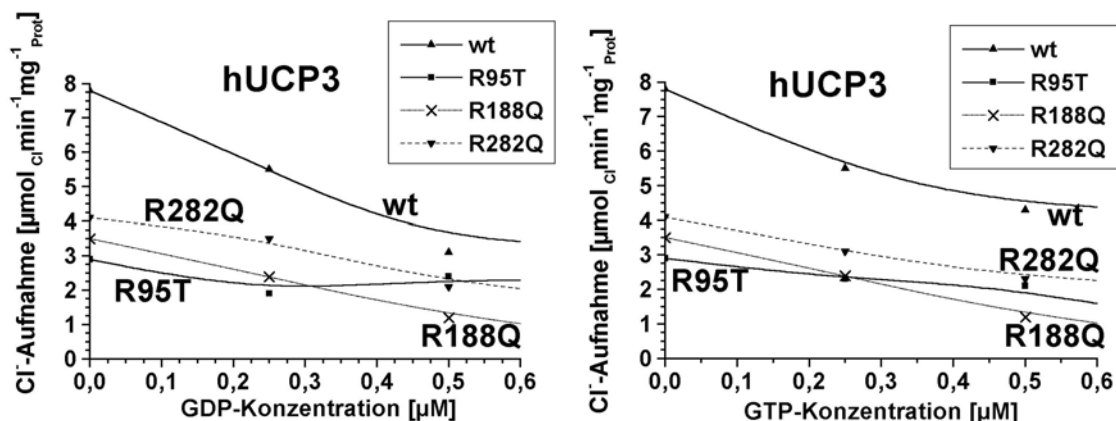


Abbildung 3-30

Titration mit GTP und GDP der Chloridaufnahme in die Proteoliposomen rekonstituiert jeweils mit R95T, -R188Q und R282Q. Die Abbildungen zeigen die von der Dosis abhängigen Inhibitionsraten der Cl⁻-Aufnahme durch externe Zugabe von GDP bzw. GTP. Dabei wurden die Cl⁻-Transportaktivitätsmessungen wie in der Legende von Abb. 3-17 beschrieben durchgeführt.

Genauso ist die Dansyl-GDP- und -GTP-Bindung für R188Q um 44 % mit GDP und um 31 % mit GTP verringert. Im Fall der Mutante R282Q sinkt die Bindungsstärke an UCP3 sogar um 68 % für GDP und um 59 % für GTP. Bei allen drei Mutanten ist die Differenz zwischen der Bindung von hUCP3 an Purinnucleosiddi- und-triphosphate vermindert (wt: 35 %, R95T: 9 %, R188Q: 20 % und R282Q: 16 %). Das könnte auf eine stärkere Wechselwirkung der basischen Reste der Arginine mit den Purinnucleosiddiphosphaten als mit Triphosphaten hindeuten.

Bei der Bestimmung der Cl^- -Transportaktivität zeichnet sich für alle drei Arg-Mutanten von hUCP3 eine deutliche Verringerung der Aktivität gegenüber wt ab. Dabei sinkt von R95T die Anionentransportleitfähigkeit auf 37 %, die von R188Q auf 45 % und die von R282Q auf 53 % (siehe auch Abb. 3-28a). Die Inhibierung des Cl^- -Transportes durch Purinnucleotide ist für R188Q und R282Q schwächer und bei R95T fast ganz aufgehoben (Abb. 3-30). Erst mit 10 μM GDP präsentieren alle 3 Mutanten samt dem Wildtyp eine praktisch vollständige Inhibierung des Anionentransportes durch UCP3, die möglicherweise auch auf Grund einer Kompetition des Nucleotids mit Cl^- verursacht wurde. Demnach könnten die intrahelicalen Arginine R95, R188 und R282 am Anionentransport beteiligt sein, insbesondere die Aminosäure R95. Nach der Tab. 3-17 müssen hierbei jedoch die niedrigen Proteineinbauraten in die Lipidvesikel für die Mutanten R188Q und R282Q mitberücksichtigt werden.

Zusammenfassend resultiert für die drei substituierten Arginine eine Mitwirkung an der Purinnucleotidbindung in UCP3 und an der Inhibierung des Protonentransportes, vor allem durch R188Q und R282Q. Jedoch wird die Protonentransportaktivität durch Neutralisation dieser basischen Reste nicht beeinträchtigt. Eine Beeinflussung des Anionentransportes sowie seiner Inhibierung erfolgte durch alle drei Arginine, insbesondere durch R95.

3.8.4. Mutation des Arginins R96 in hUCP2

Für hUCP2-wt konnte in den vorhergehenden Kapiteln ein Protonen- und auch ein Anionentransport samt Inhibierungen durch Purinnucleotide und eine Bindung von Purinnucleotiden an hUCP2 festgestellt werden. Das Transport- und Bindungsverhalten von hUCP2 verläuft ähnlich wie das von E. coli exprimierten hUCP1 haUCP1 (siehe Kap. 3.5., 3.6. und 3.7.). Viele Aminosäuren, die an den Funktionen von UCP1 beteiligt sind (Echtay et al., 1997, Bienengraber et al., 1998, Echtay et al., 1998, 2000 und 2001), kommen auch an gleicher Stelle in der AS-Sequenz von hUCP2 vor. Aus der Abb. 3-21 ist zu entnehmen, dass das Arginin R96 in der 2. Helix der ersten Domäne von hUCP2 liegt und in allen UCP-Carriern

konserviert ist. Von Echta et al. (2000) wurde das entsprechende Arg R91 substituiert und eine pH-abhängige schwächere Inhibierung der Nucleotidbindung bemerkt sowie eine extreme Verringerung des Anionentransportes durch UCP1 ohne Einfluss auf den Protonentransport zu nehmen. Ähnlich war das Transportverhalten der Mutanten R95T von hUCP3 während der Bindung an Dansyl-GDP- bzw. -GTP und der Inhibierung des Protonentransportes von hUCP3 durch Purinnucleotide, jedoch nicht der Hemmung des Cl^- -Transportes (siehe Kap 3.8.3. Tab. 3-17, Abb. 3-29 und Abb. 3-30). In der Tab. 3-18 sind die wichtigsten Daten zur Expression, Rekonstitution, Transportverhalten und Inhibierung sowie Purinnucleotidbindungsverhalten der Mutante R96T dargestellt.

Die Expression der Mutante R96T lieferte die gleiche Proteinmenge wie der Wildtyp. Die H^+ -Transportgeschwindigkeit von hUCP2 war nach der Tab. 3-18 und der Abb. 3-31 nur um 15 % niedriger und ist wahrscheinlich auf die etwas niedrigere Einbaurrate von R96T in die Phospholipidvesikel zurückzuführen. Bei der Inhibierung der Protonentransportaktivität durch Purinnucleotide als auch bei der Dansyl-GDP- bzw. GTP-Bindung wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wie auch der Abb. 3-32a zu entnehmen ist. Maximale Hemmung wird bei R96T bereits mit geringen ADP- bzw. ATP-Konzentrationen erreicht. Schon mit 0.2 μM ADP bzw. ATP wird mit R96T eine Sättigung bei der Inhibierung erlangt.

Tabelle 3-18

Messwerte für die Mutante R96T im Vergleich mit dem Wildtyp: IB-E. coli-Expressionsraten, Einbau in Lipidvesikeln (eingesetzte Proteinmenge für Einbau in Vesikel = 100 %, Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Amido-Black-Methode), H^+ - und Cl^- -Transportaktivitäten samt Inhibierungen durch Purinnucleotide sowie Purinnucleotidbindungsanteil (100 % = Purinnucleotidbindung an natives haUCP1)

	hUCP2- wt	hUCP2- R96T
Expressionsmenge der gereinigten IB aus <i>E.coli</i> [$\text{mg}_{\text{IB}} \text{ml}_{\text{Medium}}$]	62	62
Einbau von UCP in Lipidvesikeln [%] für H^+-Transport	41	31
H^+-Transportaktivität v/c [$\mu\text{mol}_{\text{H}^+} \text{relativ min}^{-1} \text{ml}^{-1} \text{Protein}$]	82	70
Inhibierung der H^+-Transportaktivität durch 10 μM ADP [%]	42	42.7
Einbau von UCP in Lipidvesikeln [%] für Cl^--Transport	44	42
Cl^--Transportaktivität J_{Cl} [$\mu\text{mol}_{\text{Cl}^-} \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1} \text{Protein}$]	5.0	2.2
Inhibierung der Cl^--Transportaktivität durch 10 μM GDP [%]	86	100
Dansyl-GDP-Bindung [%]	35	38
Dansyl-GTP-Bindung [%]	42	39

Analog zu den entsprechenden Mutationen in UCP1 und UCP3 wurde durch Neutralisation des basischen Restes von R96 in hUCP2 der Anionentransport drastisch vermindert. Nur noch 44 % der Cl^- -Transportaktivität waren bei R96T erhalten im Vergleich zum wt (100 %). Interessant ist, dass im Gegensatz zur Neutralisation von R95 von hUCP3 bei R96 von

hUCP2 der Anionentransport durch die Zugabe von GTP fast vollständig gebremst wurde. Diese Wirkung war jedoch mit GDP sehr abgeschwächt.

Aus den Resultaten kann geschlossen werden, dass R96 weder an dem Protonentransport noch an der Purinnucleotidbindung oder an der Transporthemmung durch Purinnucleotide beteiligt ist. Jedoch scheint R96 von besonderer Wichtigkeit für den Anionentransport zu sein. Es ist anzunehmen, dass UCP2 genauso wie UCP1 und UCP3 über eine gleichartige Regulation für den Anionentransport verfügen.

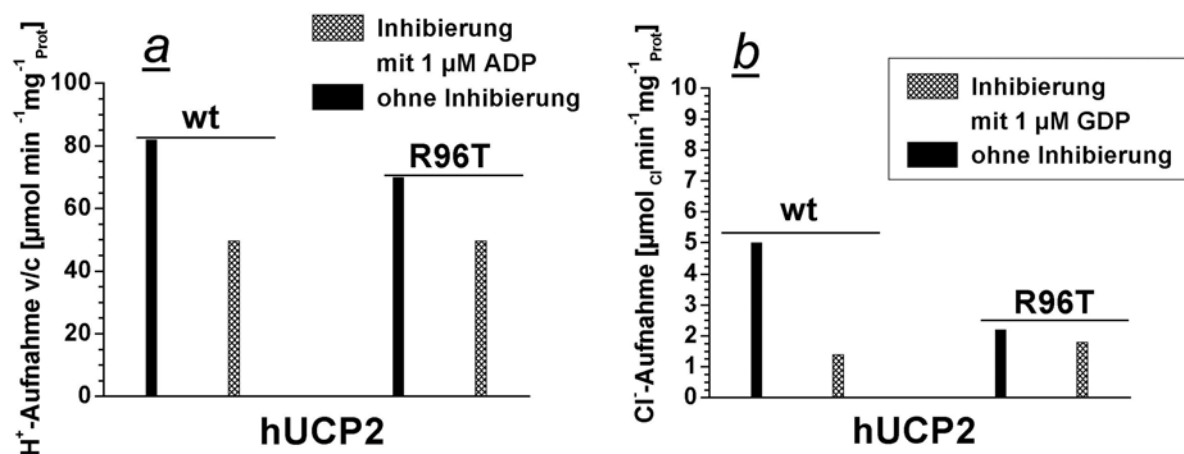


Abbildung 3-31a+b

Protonen- und Chloridtransportaufnahme in die Proteoliposomen, die mit *E. coli* exprimierten hUCP2-wt und hUCP3-R96T rekonstituiert waren. Für die Bestimmung des Protonen- und Chloridtransportes erfolgten die fluorometrischen Messungen wie in der Legende unter Abb.3-14 und Abb.3-17 beschrieben.

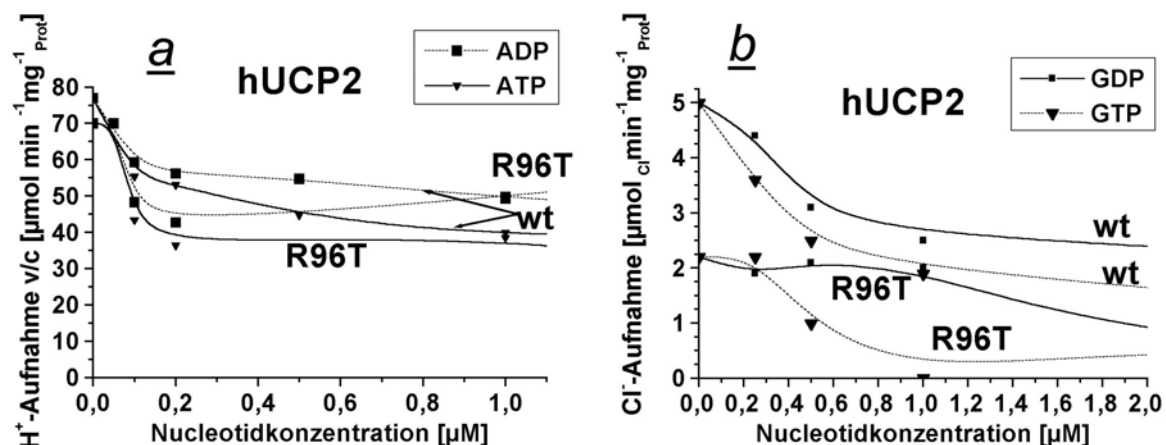


Abbildung 3-32a+b

Inhibierung des H^+ -Transportes (a) und Cl^- -Transportes (b) von hUCP2-wt und hUCP2-R96T aus *E. coli* durch Purinnucleotide. Die Protonen- und Chloridtransportmessungen wurden wie in der Legende unter Abb. 3-14 und 3-17 beschrieben durchgeführt.

4. Diskussion

4.1. Untersuchung der Funktion der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 an Mitochondrien von *S. cerevisiae*

Die humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 gehören zur mitochondrialen Carrierfamilie, zu der auch der Adeninnucleotidcarrier (AAC) sowie der Phosphattransportcarrier (P_iC) zählen. An UCP1 aus braunen Fettgewebemitochondrien von Nagetieren wurden bereits viele Untersuchungen zu seiner Funktions- und Strukturaufklärung unternommen. In *S. cerevisiae* wurde UCP1 aus Nagetieren bereits erfolgreich exprimiert (Murzda-Inglis et al., 1991; Arechaga et al., 1993; Bienengräber et al., 1998). Das Protein baut sich in die innere Mitochondrienmembran ein und weist dieselben Eigenschaften wie natives UCP1 in BAT-Mitochondrien aus Hamster auf. Die Entkopplung von Atmung und ATP-Synthese durch UCP1 konnte in diesen Mitochondrien durch Messen des Membranpotentials verfolgt werden (Arechaga et al., 1993; Bienengräber et al., 1998).

4.1.1. Expression der humanen Uncoupling Proteine in *S. cerevisiae*

Entsprechend den für die Expression von haUCP1 in *S. cerevisiae* entwickelten Bedingungen wurden die humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 in den mittelstarken Expressionsvektor pEMBLyex4 kloniert und in den W303-Hefezellen exprimiert. Nach Isolierung der Hefemitochondrien mit eingebautem UCP wurde das Membranpotential gemessen, um mögliche funktionelle Ähnlichkeiten zwischen den hUCPs und dem bereits intensiv erforschten UCP1 aus Nagetieren zu erkennen. Für eine hohe Expression in Hefe ist es günstig, das Gen direkt hinter den Promotor und ATA als Triplet vor dem Startcodon zu klonieren (Bathgate et al., 1992). Als Medium wurde Lactat-Minimalmedium verwendet, das mit allen 20 Aminosäuren plus Adenin supplementiert war und eine hohe Expression ohne möglichen Plasmidverlust gewährleistete (Bienengräber, 1998). Bei einem Vergleich der Hefeexpression von pYES2-hUCP3 long und pYES2-hUCP3 short in Voll- oder Minimalmedium wurde festgestellt, dass die Expression von hUCP3 in Minimalmedium die höheren Ausbeuten ergab (Heidkämper et al., 2000).

Da die Expression der humanen Uncoupling Proteine mit dem Plasmid pEMBLyex4 in *S. cerevisiae* nach herkömmlichen Bedingungen (Bienengräber et al., 1998) nur sehr gering ausfiel und die drei Proteine teilweise nur in Spuren in den Mitochondrien nachgewiesen werden

konnten, wurden einige Versuchsp Parameter variiert. Ein möglicher Grund für die niedrige Expressionsrate könnte die Verwendung von Basentriplets sein, die für eine Expression in eukaryontischen Genen ungebräuchlich sind. Durch einen Vergleich der für Arginin gebräuchlichen und ungebräuchlichen Basentriplets (Kap. 3.1.2., Tab. 3-2) wurde erkannt, dass in den cDNA-Sequenzen der hUCPs im Gegensatz zu der cDNA-Sequenz von UCP1 aus Nagetieren die ungebräuchlichen Basentriplets in größerer Anzahl vorhanden sind und zu Problemen bei der Translation der m-RNA führen können (z.B. haUCP1 = 3 unvorteilhafte Basentriplets). Ähnlich verhielt es sich bei der Expression des AAC in Prokaryonten, das AAC-2-Gen (Las Varenne et al., 1984) als auch das Hefe AAC-Gen (Heimpel et al., 1999) beinhalten für Arginin überwiegend Basentriplets, die für eine *E. coli*-Expression ungünstig sind und möglicherweise einen Abbruch der Proteinbiosynthese erzeugen. In der cDNA-Sequenz von hUCP3 sind die für eine *S. cerevisiae*-Expression 10 unvorteilhaften Basentriplets (Tab. 3-2) für die Aminosäure Arginin über die gesamte Sequenz verteilt, weshalb durch stille Mutation das als erstes in der UCP3-cDNA vorkommende Arginin mit der Sequenz CGG in die für die *S. cerevisiae*-Expression gebräuchliche Sequenz AGA umgewandelt wurde. Jedoch konnte keine Erhöhung der UCP3-Expressionsrate beobachtet werden. Wahrscheinlich überwog der negative Einfluss der noch verbleibenden 9 Basentriplets, die für eine *S. cerevisiae*-Expression unvorteilhaft sind. Alternativ hätte die geringe Expression und Einbaurrate durch eine Proteolyse der Proteine verursacht werden können, die aber aufgrund des Fehlens von Abbauprodukten auf dem Immunoblot ausgeschlossen wurde. Auch die humanen Uncoupling Proteine 1 und 2 weisen eine hohe Anzahl an ungebräuchlichen Basentriplets für die *S. cerevisiae*-Expression auf (hUCP1 = 7 und hUCP2 = 16 unvorteilhafte Basentriplets) und die Expression von hUCP1 und 2 in Hefe fiel auch geringer als die Expression von haUCP1 aus.

Da die Expression durch Glucose reprimiert und durch Galactose stark induziert wird, wurde die Galactosekonzentration von 0.6 % auf 2 % erhöht und erbrachte wie auch bei Hinz et al. (1999) und Liu et al. (1998) höhere UCP-Expressionsraten. Durch Verlangsamen der Schüttelgeschwindigkeit der Hefezellkulturen bei gleichzeitig verstärkter UCP-Expression durch die erhöhte Galactose-Induktion sollte die Proteingeschwindigkeit zeitlich verzögert werden, um einen möglicherweise langsamer ablaufenden Proteineinbau in die Membran nicht durch Proteinsynthesestau zu behindern. Die AG Klingenberg (Heidkämper et al., 2000) hatte auch beobachtet, dass sich hUCP3 long und short mit dem mittelstarken Expressionsvektor pYES2 nur in sehr geringen Konzentrationen in die Mitochondrienmembran einbauten. Die Carrier-Proteine werden im Cytosol ohne eine sich abspaltende Präsequenz synthetisiert, beinhalten jedoch interne Zielsequenzen. Durch einen sogenannten TOM-Komplex, eine

allgemeine Translokase, wird der Import von mitochondrialen Carrierproteinen in die äußere Membran und durch den TIM22-Komplex, eine carrierspezifische Translokase, in die innere Membran inseriert (Bauer et al., 2000). Möglicherweise wirken die humanen Uncoupling Proteine inhibierend auf die Transportfunktion des TIM22-Komplexes und verhindern dadurch ein schnelles, kontinuierliches Einbauen der Membranproteine. Nach Fink (1998) können niedrigere Proteinsyntheseraten zu einer Verminderung der Aggregatbildung führen.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Wachstum der Hefezellen nach der Induktion mit Galactose trotz Verändern der Anzuchtsparmeter nur wenig verlangsamt wurde und keine Unterschiede zwischen Hefezellen mit und ohne UCP aufwies. Dies ähnelt den Resultaten bei der Expression von haUCP1 in *S. cerevisiae* (Klingenberg et al., 2000). Möglicherweise inhibieren auch endogene Purinnucleotide die Entkopplung der Mitochondrien durch exprimiertes UCP oder es liegen nicht genügend freie Fettsäuren für die Aktivierung von UCP vor. Durch Verlangsamen der Schüttelgeschwindigkeit der Zellkultur muss auch das verminderte aerobische Zellwachstum berücksichtigt werden, das die Atmung der Mitochondrien verringert.

Durch Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, dass die Expression der hUCPs in den Hefemitochondrien höher ausfiel und die SDS-solubilisierten hUCPs eindeutig nachgewiesen werden konnten. Um den Anteil des in die native Konfiguration gefalteten UCP-Proteins in den Hefemitochondrien zu bestimmen, wurden die in SDS gelösten hUCPs in dem nicht-ionischen Detergens Triton solubilisiert. Der Immunoblot ergab, dass sich hUCP1 fast vollständig in Triton löste, während die Spots für Triton-solubilisiertes hUCP2 und hUCP3 fast nicht mehr zu erkennen waren. Im Fall von hUCP2 ist zu berücksichtigen, dass hUCP2 mit einem für hUCP3-sensitiven Antikörper AK hUCP3 B nachgewiesen wurde, dessen Affinität für hUCP2 um das zehnfache niedriger als für hUCP3 ist. Möglicherweise konnten Spuren von Triton-solubiliertem UCP2-Protein nicht mehr detektiert werden und das eingebaute hUCP2-Protein verfügt über UCP-spezifische Eigenschaften. Der sehr geringe Anteil des in die Mitochondrien eingebauten UCP2 und UCP3-Proteins könnte jedoch auch eine Entkopplung der Mitochondrien ohne Nucleotid-Hemmung verursacht haben, so dass kein weiterer UCP-Einbau in die Mitochondrien stattfand und der größte Anteil des exprimierten UCP2 und 3 als Inclusion Bodies ausfiel. Demnach würde der Proteineinbau und nicht die Proteinsynthesestärke in Hefe den limitierenden Faktor für ein funktionsfähiges UCP-Protein darstellen. Auf Grund des niedrigen Anteils an eingebautem hUCP2 und hUCP3 in den Hefemitochondrien ist das Hefeexpressionssystem nicht vorteilhaft für die Bestimmung der UCP2- und 3-Funktionen. Dahingegen kann die Funktion von hUCP1 ähnlich wie die von haUCP1 in *S. cerevisiae* exprimiert ermittelt werden. Die fast vollständige Solubilisierung von hUCP1 in

Triton deutete auf eine korrekt gefaltete native Konfiguration entsprechend BAT-haUCP1 hin, die vollkommen funktionsfähig in die Hefemitochondrienmembran eingebaut wurde. Demzufolge wirkte sich die verminderte Schüttelgeschwindigkeit der Zellkultur während der Expression positiv auf die Importmaschinerie von hUCP1 in die Membran aus, was an der verringerten Proteinsynthesegeschwindigkeit während der Expressionsphase liegen kann.

Wichtig für die korrekte Insertion von hUCP2 und hUCP3 in die Membran ist außerdem der pH-Wert (Slavik, 1982). Möglicherweise benötigen hUCP2 und hUCP3 für die Importmaschinerie in die Mitochondrienmembran einen anderen umgebenden pH-Wert als hUCP1. Denn sie verfügen insbesondere in dem ‚Loop‘ zwischen der dritten und vierten Helix auf Matrixseite, der vorrangig am UCP-spezifischen H^+ -Transport beteiligt ist, über eine zu UCP1 höhere Anzahl von sauren und basischen Resten. Auch die Aminosäureähnlichkeiten zwischen den drei UCP-Varianten (UCP1 mit UCP2: 58 % und UCP1 zu UCP3: 55 %) sind nicht sehr hoch und könnten auf einen anderen Verlauf des Proteineinbaus schließen lassen.

Ähnliche Ergebnisse hatte die AG Klingenberg sammeln können, die haUCP1 und mUCP1 im Vergleich mit hUCP3 short und long sowie mit mUCP3 in Hefe exprimiert hatten (Heidkämper et al., 2000; Winkler et al., 2001). Die Forscher um Klingenberg konnten bei Einsatz von Hefeexpressionsvektoren mit extrem hoher Expressionsstärke (pGal110) eine Verzögerung des Zellwachstums für hUCP-beinhaltende Zellen beobachten. Dabei stellten Winkler et al. (2001) durch Immunopräzipitation fest, dass mUCP1 in einem nicht-ionischen Detergens (Triton X-100) genauso wie in einem ionischen (Sarkosyl) vollkommen löslich war und damit dem nativen UCP1 aus Hamster-BAT-Mitochondrien entspricht, das in Triton X-100 solubilisiert, über alle seine funktionellen Fähigkeiten verfügt. Dagegen ließ sich das in hohen Konzentrationen exprimierte hUCP3 in Triton nur in sehr geringem Maß lösen. Bei der Isolierung der Mitochondrien bemerkte die AG Klingenberg auch, dass der größte Anteil des exprimierten UCP3 nicht in die innere Mitochondrienmembran eingebaut war und außerhalb dieser wahrscheinlich in Form von Inclusion Bodies aggregiert vorlag.

Für eine Verlangsamung der Schüttelgeschwindigkeit der Hefezellkultur während der Expressionsphase sprechen im Fall von UCP1 die Ergebnisse der AG Brand, die alle drei UCPs von Mensch und Maus in Hefe verschieden stark exprimiert und die H^+ -Transfer gemessen hatten (Stuart et al., 2001a+b; Harper et al., 2002). Die AG Brand (Stuart et al., 2001a) stellte für UCP1 fest, dass UCP-unspezifische Effekte für hochexprimierende Plasmide bereits bei niedrigeren UCP1-Expressionsspiegel vorkommen als bei in-vivo Kälte-adaptierten BAT-Mitochondrien. D. h., dass UCP1 bei Expression in Hefe sowohl von der Synthesestärke als auch von dem Proteineinbau in die Membran abhängt, um ein funktionsfähiges UCP1-Protein

zu erhalten. Die BAT-Mitochondrien benötigen einige Tage, um den UCP1-Gehalt bei Anpassung an die Kälte mehrfach zu erhöhen, während bei den Hefeexpressionssystemen solche Konzentrationen in ein paar Stunden exprimiert werden.

Die AG Brand, die hUCP2 in *S. cerevisiae* mit drei verschiedenen starken Expressionsplasmiden exprimiert hatte, beobachtete nur für den hochexprimierenden Hefevektor eine Inhibierung des Zellwachstums. Dabei lag die Konzentration mit 4 µg hUCP2/ mg mitochondriales Protein um mehr als das zehnfache über dem höchsten in-vivo gemessenen Wert in der Milz. Die niedriger exprimierten hUCP2-Konzentrationen wiesen weder eine Entkopplung der Mitochondrien noch einen Protonentransport auf. Stuart et al. (2001b) erklärten dieses Phänomen mit einer unkorrekten Faltung von UCP2 im Hefesystem und die mitochondriale Entkopplung bei erhöhten UCP2-Spiegel als eine nicht durch native UCP2-Aktivität verursachte anders geartete mitochondriale Funktion. Die Ergebnisse der AG Brand (Harper et al., 2002) für die Expression von hUCP3 in Hefe entsprachen denen für hUCP2 (siehe oben). Auch nach Meinung der AG Brand können hUCP2 und hUCP3 nicht in einer funktionellen Form in Hefe exprimiert werden.

Viele Forschergruppen hatten UCP2 und 3 in *S. cerevisiae* exprimiert und eine Inibierung des aeroben Zellwachstums während der Expressionsphase sowie keinerlei Hemmung des Protonenflusses beobachtet. Daraus folgerten sie, dass UCP2 und 3 einer anderen Regulation des Protonentransportes als UCP1 unterliegen und möglicherweise verschiedene physiologische Funktionen besitzen (Gimeno et al., 1997; Fleury et al., 1997; Hinz et al., 1999; Hagen et al., 1999, 2000 und Brown et al., 1999). Diese Forscher untersuchten allerdings nicht den Anteil an eingebautem UCP-Protein in die Hefemitochondrien und können somit auch keine Aussage über den Anteil an UCP-spezifischem Protonentransport machen.

Durch Verwenden des SMAT-Mediums (Minimalmedium + Pepton und Hefeextrakt) für die Hefeanzucht mit dem Plasmid pEMBLyex4-hUCP3 und pEMBL-yex4-hUCP1 konnte ein verstärktes Zellwachstum beobachtet werden, das auf die zugesetzten wachstumsfördernden Nährstoffe zurückzuführen ist. Während der Anzucht proteolytierte hUCP3. Die Proteindegradation zu dem 21 kDa-Konstrukt von hUCP3 findet vor der Insertion in die Membran statt (Hinz et al., 1999). Durch Solubilisieren des verkürzten hUCP3-Proteins konnte eine kleinere Menge davon in Triton gelöst werden, was auf eine geringe Konzentration des hUCP3-Konstruktes in nativ gefalteter Konfiguration hindeutet. Für den funktionsfähigen Einbau von hUCP3 in Hefemitochondrien ist vermutlich nur eine der sechs Helices kritisch, die in ihrer nativen transmembranen Form nicht durch Wechselwirkungen mit Hefephospholipiden stabilisiert werden kann. Möglicherweise ist dieser instabile Anteil von hUCP3 durch

die Proteolyse abgespalten worden und der Proteinrest wurde direkt in die Membran eingebaut. Für hUCP1 ergaben sich keine besseren Daten für die Expressionsmenge und den Anteil an eingebautem Protein, so dass das Minimalmedium dem SMAT-Medium vorzuziehen ist.

4.1.2. Fettsäureaktivierung und Purinnucleotidinhibierung der in Hefe exprimierten hUCPs

Die Entkopplung des UCP1 wurde in den transformierten Hefemitochondrien über die Messung der Atmung und des Membranpotentials $\Delta\Psi$ bestimmt (Murzda-Iglis et al., 1991; Arechaga et al., 1993; Bienengraber et al., 1998). Durch freie Fettsäuren wird die mitochondriale Atmung beschleunigt und das Membranpotential abgebaut. Beide Effekte können durch Purinnucleotide inhibiert werden. Die Membranpotentialmessungen zur Ermittlung der UCP-Aktivitäten wurden mit dem potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoff diSC₃ durchgeführt, der aus zwei Gründen limitiert ist: Nur in einem engen Konzentrationsbereich ist der Effekt freier Fettsäuren spezifisch auf die Aktivität von UCP zurückzuführen. Auch andere mitochondriale Carrier, insbesondere AAC und weitere Proteine können die Entkopplung des Membranpotentials bewirken (Skulachev, 1998).

Bei verlangsamter Hefewachstumsgeschwindigkeit und gleichzeitig verstärkte Expression sowie eher saurem pH-Wert wurden die hUCP1-haltigen Hefemitochondrien durch Fettsäuren wie Laurinsäure sehr stark entkoppelt. Durch Purinnucleotide, insbesondere durch GTP kann diese Entkopplung vollständig inhibiert werden. Damit weist das humane UCP1 ähnliche Eigenschaften wie UCP1 aus Nagetieren auf und wurde in seiner nativen Konfiguration in die Mitochondrien eingebaut. Ähnlich wie bei haUCP1 (Huang und Klingenberg, 1995; Klingenberg 1999) sinkt mit zunehmendem pH-Wert von pH 6.2 auf pH 6.8 die Hemmung der hUCP1-Aktivität durch GDP und gleichzeitig steigt die Aktivierung durch Laurinsäure an. Nach diesen Resultaten könnte UCP1 im BAT des Menschen in gleicher Weise fungieren wie UCP1 in Hamster-BAT. Die Ergebnisse legen nahe, dass das Membranpotential von UCP1 an Hefemitochondrien bestimmt werden kann. Die Verwendung von Brom-Palmitat (50 μ M) anstatt Laurinsäure (50 μ M) zur UCP-Aktivierung resultierte in einer stärkeren Entkopplung mit sehr geringer Inhibierung. Laurinsäure scheint wegen seiner kürzeren Kohlenstoffkettenlänge (C₁₂) als Fettsäure-Aktivator für hUCP1 eher geeignet zu sein.

2-Brom-Palmitat ist ein nicht metabolisierendes Fettsäure-Derivat, das rUCP1 aus Ratte stimuliert, nicht aber hUCP3 (Hagen et al., 2000). Bouillaud et al. (1994) hatten das Membranpotential $\Delta\Psi$ an Hefe exprimierten rUCP1-Mitochondrien gemessen und eine starke

mitochondriale Entkopplung mit Palmitat sowie deren vollständige Inhibierung mit GDP beobachtet. Jedoch konnte $\Delta\Psi$ erst mit einer zweiten Portion Palmitat ($2 \times 64 \mu\text{M}$) gesenkt und mit einer sehr hohen Konzentration an GDP ($2 \times 1 \mu\text{M}$) wieder zurückgeführt werden. Die Resultate von Bouillaud zeigen auch, dass Laurinsäure spezifischer als Palmitat für die Bestimmung der mitochondrialen Entkopplung durch UCP1 ist.

Für die hUCP2-haltigen Hefemitochondrien resultierte aus den Membranpotentialmessungen ($\Delta\Psi$) eine erhöhte Entkopplung der Mitochondrien durch Laurinsäure, die durch Purinnucleotide nur gering gehemmt wurde. Dabei war die Inhibierung durch GTP stärker als durch GDP ähnlich wie bei UCP1. Demnach könnte die Regulation der mitochondrialen Entkopplung von UCP1 und UCP2 über einen analogen Mechanismus ablaufen. Ein Teil dieser Entkopplung wurde weder durch GDP noch durch GTP inhibiert und beruht wahrscheinlich auf einer UCP2-unspezifischen Reaktion. Der Anteil an eingebautem UCP2-Protein in die Mitochondrien (= Triton-löslicher UCP2-Anteil, siehe Kap 4.1.1.) war sehr gering und die $\Delta\Psi$ -Änderungen waren somit nur zu einem kleinen Teil zu erfassen. Das Hefeexpressionssystem ist für eine genauere Bestimmung der hUCP2-Funktionen nicht geeignet.

Ähnliche Ergebnisse wurden für hUCP3-haltige Hefemitochondrien erhalten, die durch Laurinsäure mittelstark entkoppelt wurden. Diese Entkopplung konnte durch Purinnucleotide nur in geringem Maß inhibiert werden. Dabei war die Hemmung bei hUCP3 im Kontrast zu hUCP1 und 2 tendenziell stärker durch GDP als durch GTP ausgeprägt und könnte auf eine zu UCP1 und 2 verschiedene Regulation der mitochondrialen Entkopplung hindeuten. Durch stärkeres Verlangsamen der Zellkulturschüttelgeschwindigkeit während der Expressionsphase ergaben sich für hUCP3 keine entscheidenden Verbesserungen seiner spezifischen Aktivität. Auch leichtes Erhöhen oder Senken der Wachstumstemperatur der Zellkultur erbrachte für alle drei hUCPs keine Vorteile und erhöhte nur den Anteil an Nucleotid-insensitiver Entkopplung. Das mit dem SMAT-Medium (Hefemedium, siehe Kap 4.1.1.) erzeugte und proteolysierte hUCP3-Protein zeigte keine Inhibierung der mitochondrialen Entkopplung und ist wahrscheinlich unspezifischer Natur. Das kritische Element bei der UCP3-Faltung in der Membran könnte den Bereich zwischen der 5. und 6 Helix auf der Matrixseite betreffen, der nach verschiedenen Hinweisen, an haUCP1 getestet (Mayinger und Klingenberg, 1992; Winkler und Klingenberg, 1992; Gonzalez-Barroso et al., 1997), in Kontakt mit gebundenem Nucleotid steht. Für hUCP3 war der Anteil an eingebautem Protein in die Hefemitochondrien bei allen durchgeführten Anzuchten extrem niedrig und ähnlich wie bei hUCP2 konnte somit auch hUCP3 mit dem Hefeexpressionssystem nicht genauer in seiner Funktion definiert werden. Das Verändern der Wachstumsbedingungen der Hefezellkulturen hat insgesamt be-

trachtet, keine Verbesserungen für die Importmaschinerie von UCP2 und 3 in die Hefemitochondrien ergeben.

Für hUCP2 und hUCP3 in *S. cerevisiae* exprimiert, hatten schon verschiedene andere Forschergruppen eine Entkopplung der Hefemitochondrien, die nicht oder nur sehr schwach gegenüber Purinnucleotiden sensitiv war, festgestellt (Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997; Hinz et al., 1999, Hagen et al., 1999, Brown et al., 1999; Heidkämper et al., 2000 und Winkler et al., 2001). Rial et al. (1999) konnten hUCP2, exprimiert in Hefe, mit all-trans Retinoidsäure bei einem pH-Wert von 7.3 stimulieren und deuteten dies so, dass die Entkopplungsaktivität von UCP2 durch eine pH-Änderung und Retinoidsäure reguliert werden kann. Da Retinal keine aktivierende Wirkung zeigte und für die UCP1-Aktivierung durch Fettsäuren eine Carboxylgruppe wichtig ist, könnte die Carboxylgruppe der Retinoidsäure an UCP2 binden.

Die Forschergruppen von Klingenberg und Brand (Winkler et al., 2001; Stuart et al., 2001; Harper et al., 2002) vermuteten jedoch, dass hUCP2 und hUCP3 in Hefe als Expressionssystem nicht in einer physiologischen Struktur exprimiert werden und deshalb ihre Funktion nicht untersucht werden kann (siehe auch Kap. 4.1.1.1).

4.2. Expression, Renaturierung und Rekonstitution von hUCP1, 2 und 3 in *E. coli*

4.2.1. Expression in *E. coli*

Wegen der geringen Expression in *S. cerevisiae* und schwachen Insertion in die Mitochondrienmembran wurden die humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 in *E. coli* exprimiert. Durch Überexpression von eukaryontischen mitochondrialen Membranproteinen in einem Prokaryontenexpressionssystem entstehen in hohen Konzentrationen Inclusion Bodies (Einschlusskörperchen, IB) durch die Aggregation nicht nativer Proteine. Für die *E. coli*-Expression wurden die hUCPs in das IPTG-induzierbare pET-Expressionsplasmid von Studier und Moffatt (1986) kloniert, das durch den streng regulierbaren Bakteriophagen T7-Promotor reguliert wird. Die Verwendung des BL21(DE3)pLysS Zellstammes garantiert durch Anwesenheit von Lysozym eine Repression basaler Expression der T7-RNA-Polymerase, die ohne Lysozym durch *E. coli* RNA-Polymerasen induziert wird. Erst die Induktion durch IPTG initiiert die Transkription des T7-RNA-Polymerase-Gens des Bakteriophagen λ DE3. Die T7-RNA-Polymerase bindet an keinen der Promotoren des *E. coli*

Genoms, sondern ausschließlich an der T7-Promotorregion des pET24a-hUCP-Plasmids. Dadurch führt die Induktion nur zur hUCP-Expression, die als inaktive Proteinaggregate (IB) im Cytoplasma von *E. coli* angereichert werden. Die Überexpression von eukaryontischen Membranproteinen in Prokaryonten kann mit Schwierigkeiten verbunden sein, die oft auf der Toxizität des exprimierenden Proteins für die Zelle oder dem Abbau durch Proteolyse im Cytosol beruhen (Schertler, 1992). Speziell für toxische Expressionsprodukte ist das BL21(DE3)-Plasmid geeignet, das eine geringe oder überhaupt nicht stattfindende Proteinexpression verhindern sollte.

Bei der *E. coli*-Expression ergab sich für hUCP3 die höchste Proteinkonzentration von 111 mg hUCP3/ 1 Kulturmedium bei einer IPTG-Konzentration von 1 mM und einer Expressionsdauer von knapp 3 h. Für IB-hUCP2 resultierten 70 mg hUCP2/ 1 Kulturmedium und für IB-hUCP1 zuerst nur ca. 3 mg hUCP1/ 1 Kulturmedium. Die IB-hUCPs wurde in dem ionischen Detergens Sarkosyl solubilisiert und zu ihrem Nachweis ein Immunoblot durchgeführt. Dabei konnten hUCP2 und 3, nicht jedoch hUCP1 eindeutig nachgewiesen werden. Mit dem stark ionischen Detergens SDS konnte jedoch IB-hUCP1 solubilisiert und durch SDS-Gelelektrophorese als Bande detektiert werden. Nach Rudolph und Fuchs (1988) kann es während der Proteinaggregation in der reduzierenden Umgebung des Cytosols zur spontanen Bildung von Disulfidbrücken kommen, deren Spaltung stärkerer Detergentien wie SDS bedarf.

Auf die Nutzung von *E. coli* gebräuchlichen oder ungebräuchlichen Basentriplets innerhalb der hUCP-cDNAs kann die geringere Expression von hUCP1 nur zum Teil zurückgeführt werden. Da für hUCP1 nach der Tab. 3-8 eine höhere und damit für die Expression in *E. coli* ungünstige Anzahl von unvorteilhaften Basentriplets für Arginin resultiert. Ein weiterer Grund für die niedrige hUCP1-Expression könnten die sehr GC-reichen Anfangssequenzen der cDNA von hUCP1 hinter dem Startcodon sein. Daher wurden mehrere stille Basenaustausche (C,G gegen A,T) in den Anfangssequenzen der cDNA durchgeführt. Die Konzentration an exprimiertem, in Sarkosyl solubilisiertem UCP1-Protein stieg um mehr als das zehnfache auf 34 mg hUCP1/ 1 Kulturmedium an und konnte mit dem Antikörper AKhaUCP1 direkt nachgewiesen werden. Nach Mahlke (1991) kann durch stille Mutation in der 5'-Region der cDNA eines Membranproteins eine bessere Expression in *E. coli* erreicht werden. Auch Barnes (1991) und Wada (1991) konnten durch AT-reiche Modifikationen N-terminaler Codons die Expression verschiedener Proteine steigern.

Durch weiteres Erhöhen der IPTG-Konzentration (2 mM IPTG) konnten für hUCP1 (48 mg/ 1 Kulturmedium) und hUCP2 (92 mg/ 1 Kulturmedium) die IB-Proteinausbeuten weiter

gesteigert werden. Die Proteinexpressionsmenge ist somit eine Funktion der IPTG-Konzentration. Die durch heterologe Überexpression in *E. coli* gebildeten Inclusion Bodies von hUCP1, 2 und 3 sind intrazelluläre, unlösliche Proteinaggregate aus biologisch inaktiven und nicht korrekt gefalteten Proteinen. Als Hauptkomponente findet sich in den IBs das Fremdgenprodukt sowie weitere Komponenten wie Wirtsproteine (DNA-Polymerase), Ribosomenpartikel und Plasmid-DNA (Kane und Hartley, 1988). Die Reinheit der isolierten IB-hUCPs stieg mit zunehmender Konzentration an exprimiertem Protein und war für hUCP3 am höchsten.

Strukturanalysen von IB bewiesen, dass aggregierte IB-Proteine teilweise ähnliche Sekundärstruktureigenschaften wie natives Protein beinhalten (Oberg, 1994). Die Überexpression allein erzeugt eine hohe Konzentration an wachsenden Polypeptidketten, welche die Bildung von inaktiven Aggregaten bereits ausreichend induzieren können. Unvorteilhafte Aggregationsreaktionen werden wahrscheinlich durch nichtspezifische Wechselwirkungen von vorrangig ungefalteten Polypeptidketten als auch durch fehlerhafte Wechselwirkungen von partiell strukturierten Faltungsintermediaten erzeugt (Rudolph und Lilie, 1996). Es wird allgemein vermutet, dass sich IB als eine Konsequenz der Zusammenlagerung von nicht-nativen Monomeren zu einem wachsenden Polymer bilden (Fink, 1998).

4.2.2. Optimierung der Renaturierung

Durch Solubilisierung in dem Detergens Sarkosyl und anschließende Digitoninbehandlung konnten die als IB exprimierten hUCPs wieder weitestgehend in ihre native Konfiguration überführt und ihre Transporteigenschaften (Kap. 4.3.) ähnlich wie mit haUCP1 ermittelt werden.

Nach Solubilisierung der IB werden native Proteine aus dem inaktiven Material durch Verwenden von in-vitro Faltungstechniken erzeugt (Rudolph und Lilie, 1996). Zur Solubilisierung der IB sind nach Rudolph und Lilie (1996) sehr starke denaturierende Agenzien wie 6 M GdmCl oder 6 bis 8 M Urea erforderlich, die aber für UCP ungeeignet waren, da sie die nachfolgenden Transport- und Bindungsmessungen gestört hätten. Mit ionischen Detergentien können auch Protein-Protein-Wechselwirkungen, wie sie in aggregierten Proteinen vorkommen, aufgebrochen werden (Lichtenberg et al., 1983). Mit dem anionischen Detergens N-Laurylsarcosin (Sarkosyl) konnten die hUCPs in eine aktive und weitestgehend korrekt gefaltete Konfiguration übergehen. Erstmals konnte Frankel et al. (1991) Sarkosyl erfolgreich für die Solubilisierung von IB nutzen und von Fiermonte et al. (1991) wurde der erste aggre-

gierte mitochondriale Carrier aus IB mit dem anionischen Detergens renaturiert. Durch Zugabe von Thiolreagenzien mit niedrigem Molekulargewicht (z. B. Dithioerythritol oder 2-Mercaptoethanol) in Kombination mit Chaotrophen wird die Reduktion der sich bei der IB-Faltung spontan gebildeten und nicht korrekt gefalteten Disulfidbindungen durch Thiol-Disulfid-Austausch ermöglicht (Schoenmaker et al., 1985).

Um die Rückfaltung der in Sarkosyl solubilisierten hUCPs in eine native Konfiguration zu erkennen, wurden die hUCPs in Vesikeln rekonstituiert und die H^+ -Transportaktivität samt Inhibierung bestimmt. hUCP zeigte zwar eine hohe Aktivität, die jedoch nur gering gehemmt werden konnte. Das bedeutet, dass entweder hUCP in dem Detergens nicht vollständig zurückgefaltet und damit das Bindungsverhalten von hUCP verhindert wurde oder das anionische Detergens konkurrierte als Fettsäure-Analogon mit der Aktivierung des H^+ -Transportes durch freie Fettsäuren. Nach einer Vorschrift von Echay et al. (2000) für in *E. coli* exprimiertem haUCP1 wurde bei den hUCPs durch Dialyse das ionische Detergens Sarkosyl durch das neutrale Detergens Digitonin ausgetauscht und zum Entfernen aller Sarkosylspuren mit dem Anionenaustauscherharz Dowex K21 behandelt.

Die als IB aggregierten Proteine können direkt nach der Solubilisierung ohne einen weiteren Reinigungsschritt des solubilisierten, denaturierten Proteins renaturiert werden. Denn Faltungsprozesse werden kaum durch andere Proteinfaltungen in der gleichen Umgebung beeinflusst (Jaenicke et al., 1981). Für bestimmte Proteine vermehren sich ihre Faltungsintermediate bei intermediären Konzentrationen an Denaturierungsreagenz, die durch Dialyse eine Aggregation der Faltungsintermediate auslösen. Die Renaturierung muss deshalb durch schnelle Verdünnung des denaturierten Proteins im Rückfaltungspuffer durchgeführt werden. In anderen Fällen wird eine Präzipitation des Proteins nur beobachtet, wenn die Rückfaltung unter stark nativen Lösungsmittelbedingungen abläuft und damit die stufenweise Entfernung des Denaturierungsreagenzes durch Dialyse gegenüber der Verdünnung bevorzugt wird. Gewöhnlich ist die stufenweise Verdünnung des denaturierenden Reagenz für die IB-Proteinfaltung erfolgreicher, muss aber von Fall zu Fall neu entschieden werden (Rudolph und Lilie, 1996). Zur Solubilisierung der hUCPs wurde das anionische Detergens Sarkosyl in Form einer schnellen, stufenweisen Verdünnung verwendet. Wohingegen der Austausch durch das neutrale Detergens Digitonin über eine Dialyse erfolgte, bei der kleinere zugeführte Digitoninkonzentrationen zur Protein/ Sarkosyllösung sich als vorteilhafter darstellten und der Aggregation entgegenwirkten. Ab einer bestimmten Konzentrationsgrenze für das denaturierte Protein übertrifft die Aggregation die Renaturierung (Zettlmeissl et al., 1979). Da komplett gefaltete Proteine gewöhnlich nicht mit sich faltenden Proteinen kopräzipitieren,

können hohe Ausbeuten des renaturierten Proteins pro Volumen Rückfaltungspuffer durch langsame kontinuierliche oder diskontinuierliche Zugabe des denaturierten Proteins zum Rückfaltungspuffer erhalten werden (Fischer et al., 1992). Auch Jaburek et al. (1999) konnten mit in *E. coli* exprimierten, Detergens-extrahierten und in Liposomen rekonstituierten IB-hUCP2 und IB-hUCP3 einen Protonentransport bestimmen. Für die Solubilisierung verwendeten sie Sarkosyl und für die anschließende Renaturierung über Dialysebehandlung das neutrale Detergens C₈E₅. Aber nur mit sehr hohen Purinnucleotidkonzentrationen wurde eine Inhibierung der hUCPs beobachtet, was möglicherweise auf einer unvollständigen Rückfaltung der Proteine beruht.

4.2.3. Optimierung der Rekonstitution

Zur Bestimmung der Transportaktivitäten wurden die in *E. coli* exprimierten, renaturierten hUCP1, 2 und 3 in Phospholipidvesikel eingebaut. Die AG Klingenberg (Echtay et al. 1997) hatte bereits haUCP1, exprimiert in Hefe und HTS-isoliert, erfolgreich in Liposomen für die nachfolgenden Transportleitfähigkeitsmessungen rekonstituiert. Dabei verwendeten sie zur stufenweisen Detergensentfernung das nicht-ionische Detergens C₁₀E₅ und Amberlite-XAD. Detergentien mit einer niedrigen cmc wie C₁₀E₅ bilden große Micellen, die im Gegensatz zu Triton X-100 effizient durch Adsorption mit hydrophoben Harzen wie Amberlite entfernt werden können. Dies wurde bereits 1985 von Winkler et al. für die Rekonstitution von haUCP1 aus braunen Fettmitochondrien beobachtet. Mitochondriale Carrier wurden auch schon in *E. coli* exprimiert und rekonstituiert (Fiermonte et al., 1993; Phelps et al., 1991, Kaplan et al., 1995), genauso Fragmente von UCP1 in Form von löslichen Fusionsproteinen (Miroux, 1992) und in *E. coli* exprimiertem haUCP1 (Echtay et al. 2000).

Die in *E. coli* exprimierten und renaturierten hUCPs wurden erfolgreich entsprechend dem *E. coli* exprimierten haUCP1 (Echtay et al., 2000) in Liposomen rekonstituiert unter Verwendung von C₁₀E₅ und Amberlite XAD. Das Amberlite diente zur Abtrennung des Detergens und die Mischung resultierte in einer fortschreitenden Bildung von Doppelschichtvesikeln mit eingebautem Protein. Die Detergensentfernung von den rekonstituierten Proteoliposomen ist wichtig, um die Inhibierung der Enzymaktivität und/ oder die passive Permeabilität der Liposomen auszuschalten (Paternostre et al., 1988). Für hUCP1, 2 und 3 erwies es sich als günstiger Amberlite stufenweise, in kleinen Portionen zur Protein-PC-Detergens-Lösung zuzuführen und die erste Amberlite-Portion erst 10 min nach der Protein-PC-Detergens-Durchmischung hinzuzufügen. Nach Rigaud (1995) ist die Effizienz der De-

tergensadsorption des Amberlites eine Funktion der Anfangskonzentration sowie des Zeitpunktes und der Größe der ersten Amberlite-Portion. Aus einem niedrigen Verhältnis von Beads zu Detergens im ersten Rekonstitutionsschritt resultieren homogene und relativ große Liposomen, wohingegen eine schnelle Detergensentfernung kleine, unilamellare Liposomen bildet (Levy et al., 1990). Als Alternative wurde die PC-Detergens-Suspension stufenweise zur Proteinlösung unter Beibehaltung der Amberlite-Portionen zugeführt. Dabei resultierten H^+ -Transportleitfähigkeiten durch IB-UCP mit schwacher ADP-Hemmung, wahrscheinlich auf Grund der abnehmenden Kapazität der Vesikel. Im Gegensatz dazu, wirkte sich beim AAC aus *Neurospora crassa*, der in *E. coli* als IB exprimiert, die stufenweise Phospholipid-Detergens-Zugabe während der Rekonstitution positiv auf die Transporteigenschaften aus (Heimpel et al., 1999).

4.3. Untersuchung der Transportfunktionen der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3, exprimiert in *E. coli*

4.3.1. Protonentransport der Wildtyp-hUCPs

Alle drei humanen Uncoupling Proteine, die in *E. coli* als Inclusion Bodies exprimiert, renaturiert sowie in Liposomen rekonstituiert wurden, besaßen die Fähigkeit Protonen zu transportieren. Diese Protein-Aktivität wurde in Gegenwart von Ubichinon unter Zugabe von freien Fettsäuren initiiert. Bei der Ermittlung der H^+ -Transportleitfähigkeit der hUCPs zeigte sich, dass Ubichinon CoQ₁₀, als Cofaktor zugegen sein muss. Der H^+ -Transport ist hochsensitiv gegenüber Purinnucleotiden und erfüllt damit das UCP-spezifische Charakteristikum. Grundsätzlich verhalten sich hUCP1, 2 und 3 ähnlich wie haUCP1 und könnten ähnliche physiologische Funktionen besitzen. Die Inhibierungsstärke des Protonenflusses durch UCP nahm mit höherer CoQ₁₀-Konzentration zu. Gleichzeitig stieg die H^+ -Transportaktivität ohne Nucleotidhemmung mit zunehmendem Volumen des Lösungsmittels CH₂Cl₂ für CoQ₁₀ an und ermöglichte somit einen durch Dichlormethan erzeugten unspezifischen Protonenfluss. Dieser entspricht wahrscheinlich dem nicht Nucleotid-sensitiven H^+ -Transport, wie es bereits von Echtay et al. (2000) für natives haUCP1 nachgewiesen wurde. Für hUCP2 konnte gezeigt werden, dass die maximale ATP-sensitive H^+ -Transportaktivität bei einem pH-Wert von pH 7.2 erfolgte und dass demnach hUCP2 und möglicherweise auch die anderen UCP-Varianten, einen pH-abhängigen H^+ -Transport aufweisen wie dies bereits von der AG Klingenberg (Klingenberg et al., 2000) für natives haUCP1 erkannt worden war. Auch diese Daten deuten

auf große Gemeinsamkeiten bei den drei hUCPs untereinander und mit den Nagetier-UCPs bezüglich der Proteinfunktion und Regulation hin.

Jaburek et al. (1999) hatten hUCP2 und hUCP3 in *E. coli* exprimiert und in Proteoliposomen rekonstituiert und konnten für beide Proteine die Katalyse des elektrophoretischen Flusses von Protonen und Alkylsulfonaten beobachten. Für diesen Protonenfluss waren Fettsäuren erforderlich und Purinnucleotide inhibierten den H^+ -Transport mit einer viel höheren Affinität als bei dem Vergleichsprotein UCP1 aus Ratte. Die Arbeitsgruppe Klingenberg (Echtay et al., 2000) hatte bereits für IB-haUCP1 ein Renaturierungs- und Rekonstitutionssystem entwickelt, mit dem die Protonentransportgeschwindigkeit durch UCP in ungefähr gleicher Größenordnung wie die des nativen haUCP1 aus BAT-Mitochondrien lag. Diese konnte nur durch oxidiertes CoQ₁₀ aktiviert werden, das in isoliertem nativen haUCP1 aus BAT-Mitochondrien vorhanden ist (Echtay et al., 2000).

Die in der hier vorliegenden Arbeit dargestellten H^+ -Transportgeschwindigkeiten durch hUCP2 und hUCP3 (ca. $80 \mu\text{mol}_{H+\text{relativ}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{Protein}}$) sowie die von Echtay et al. (2001) dargelegten Ergebnisse für die beiden hUCPs (ca. $110 \mu\text{mol}_{H+\text{relativ}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{Protein}}$) liegen sehr viel höher als die Messwerte von der Arbeitsgruppe Garlid (Jaburek et al., 1999: $10 - 30 \mu\text{mol}_{H+\text{relativ}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{Protein}}$) und entsprechen den Geschwindigkeiten für natives haUCP1. Die Unterschiede zur AG Garlid können wahrscheinlich durch die Abwesenheit von Ubiquinon geklärt werden. Möglicherweise spielen dabei auch Faltungsunterschiede eine Rolle, da bei der AG Garlid ein anderes Renaturierungs- und Rekonstitutionssystem (Kap. 4.2.2.) verwendet wurde. Für hUCP1 ($v/c = 50 \mu\text{M}_{H+\text{relativ}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{Prot}}$) ergab sich eine geringere Protonentransportgeschwindigkeit, die wegen der schwächeren hUCP1-Expression und den damit verbundenen stärkeren Verunreinigungen auf die Rückfaltung und Stabilität von hUCP1 zurückgeführt werden kann.. Purinnucleotide hemmen den H^+ -Transport bei allen drei *E. coli* exprimierten hUCPs bereits im $\mu\text{molaren}$ Konzentrationsbereich. Dabei wirkte sich GTP stärker auf die Inhibierung der H^+ -Leitfähigkeit von hUCP1 und 2 aus, während es bei hUCP3 eine größere Hemmung durch GDP gab. Mit sehr niedriger Nucleotidkonzentration ($0.1 \mu\text{M GDP}$) sank der H^+ -Transport für hUCP1 schon zu 50 %, während bei hUCP2 und 3 für die gleiche Abnahme die zehnfache Konzentration ($1 \mu\text{M GDP}$) erforderlich war. Demnach könnten hUCP2 und 3 bei der Nucleotidhemmung des H^+ -Transfers über einen etwas anderen Mechanismus als hUCP1 verfügen, während die physiologische Rolle von hUCP3 wegen der stärkeren Affinität gegenüber GDP anders als die von hUCP1 und 2 sein könnte. (siehe auch Kap. 4.4.)

Die Arbeitsgruppe Brand (Echtay et al., 2001) konnte durch Zugabe von Ubichinon eine GDP-sensitive H^+ -Transportleitfähigkeit in Nierenmitochondrien aus Ratte induzieren, die in Lebermitochondrien ohne Reaktion blieb. Diese Entkopplungsaktivität erforderte auch Fettsäuren und wurde durch GDP komplett inhibiert. Die AG Brand vermutete, dass CoQ_{10} in den Mitochondrien durch die Produktion von Superoxid agiert, welches eine Entkopplung erzeugt. Kürzlich wurde von der gleichen Arbeitsgruppe (Echtay et al., 2002) gezeigt, dass Superoxid die mitochondriale Protonenleitfähigkeit durch Effekte von UCP1, UCP2 und UCP3 in verschiedenen Rattengewebe steigert. Die Superoxid-induzierte Entkopplung, die in-vivo ermittelt worden ist, erfordert wiederum Fettsäuren und wird durch Purinnucleotide (50 % Hemmung mit ca. 17 μM GDP) inhibiert. Ihre Ergebnisse legen nahe, dass die Wechselwirkungen von Superoxid mit den UCPs einen Mechanismus für die Abnahme der Konzentration an reaktiven Sauerstoffverbindungen innerhalb der Mitochondrien darstellen könnte. Dagegen hatten Jaburek et al. (1999) eine sehr niedrige Sensitivität von *E. coli* exprimierten hUCP2 und 3 gegenüber Purinnucleotiden beobachtet, die bei 500 μM NTP lag. Möglicherweise wurde dieser Transport durch Diffusion des Fettsäure-Valinomycin-Kalium-Komplexes, der durch den K^+ -Gradienten induziert wird, erzeugt. Auch die verwendeten Detergentien könnten diese ternäre Komplexdiffusion steigern. Die von der AG-Brand (Echtay et al., 2002) durchgeführten Superoxid-induzierten Entkopplungen an Rattenmitochondrien verschiedener Gewebe zeigten, dass UCP1, 2 und 3 aus Ratte eine ähnliche Nucleotidspezifität untereinander besitzen und die Inhibierung durch Purinnucleosiddi- und -triphosphate in gleichem Maße erfolgte. Dabei konnte UCP2 auch in sehr geringer Form durch CTP, CDP und UTP gehemmt werden.

4.3.2. Anionentransport durch die Wildtyp-hUCPs

Alle drei Uncoupling Proteine (1, 2 und 3) sind befähigt, Chlorid-Ionen zu transportieren und dieser Transport kann durch Purinnucleotide gehemmt werden. Die Cl^- -Transportgeschwindigkeit ist für hUCP1 und hUCP3 annähernd dieselbe und entspricht ungefähr der für natives haUCP1 (Echtay et al., 1999) bestimmten Geschwindigkeit. Dagegen weist hUCP2 eine niedrigere Aktivität auf, die möglicherweise auf einer für den Chloridtransport nicht vollkommen erfolgten Rückfaltung beruht oder auf einem zu UCP1 und 3 unterschiedlichen Mechanismus. Der Anionentransport wurde im Gegensatz zum Protonentransport fast vollständig durch Purinnucleotide gehemmt. Interessant ist auch, dass der Cl^- -Transport etwa 20 mal langsamer als der H^+ -Transport ist, was zwei verschiedene Transportkanäle durch UCP vermuten lässt.

Bei der Hemmung des Anionentransportes ergab sich wiederum das gleiche Bild wie beim Protonentransport: UCP3 wurde stärker durch GDP als GTP inhibiert, wohingegen sich bei UCP1 und 2 das Verhältnis umkehrte. Mögliche Ursachen für dieses unterschiedliche physiologische Verhalten der hUCPs gegenüber Purinnucleotiden werden in Kap. 4.4. diskutiert.

4.3.3. Bindungsverhalten der Wildtyp-hUCPs

Aus den fluorometrischen Bindungsmessungen konnte entnommen werden, dass alle drei humanen UCP-Isoformen Purinnucleotide binden können und damit nach erfolgter Renaturierung der IB-hUCPs weitestgehend in ihrer nativen Konfiguration vorliegen. Dabei ist die Affinität der Bindung bei allen drei Proteinen unterschiedlich stark und entspricht grundlegend dem Inhibierungsverhalten der Transporte der hUCPs durch Purinnucleosiddi- und triphosphaten. Dabei ist die Bindung von hUCP1 im Vergleich mit hUCP2 und hUCP3 sehr viel schwächer und für Purinnucleosiddi- und triphosphate gleich groß. Als Grund für die geringere Bindungsstärke kann eine instabile Proteinstruktur, die auf Rückfaltungsproblemen beruht (siehe Kap. 4.2.2.) angenommen werden. Bei hUCP2 ist die Affinität gegenüber GTP stärker, bei hUCP3 hingegen gegenüber GDP. Durch das unterschiedliche Verhalten der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 gegenüber Purinnucleosiddi- und -triphosphaten sowohl bei der Nucleotidbindung als auch bei der Inhibierung der Transportwege von hUCP kann auf eine unterschiedliche Regulation der Proteine geschlossen werden, die unter Kap. 4.4. näher diskutiert werden. Von Echtay et al. (2001) wurden die K_i -Werte für ADP und ATP bestimmt und eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber haUCP1 und hUCP2 sowie hUCP3 beobachtet: UCP1 und UCP2 hatten eine stärkere Affinität gegenüber ATP mit einem K_i -Verhältnis $K_i^{ATP} / K_i^{ADP} = 0.5$, wohingegen UCP3 eine stärkere Affinität zu ADP mit $K_i^{ATP} / K_i^{ADP} = 3.0$ besaß. Auch Echtay et al. (2001) gingen von einer unterschiedlichen Regulation der drei UCP-Varianten entsprechend den Gewebearten aus, in denen die UCPs vorkommen.

4.3.4. Mutagenese einzelner Aminosäuren in hUCP2 und hUCP3

Zur näheren Klärung der Mechanismen der Funktionen der humanen Uncoupling Proteine wurden Mutationen in Anlehnung an die bereits erfolgten Mutationen von haUCP1 der AG Klingenberg eingeführt (Echtay, et al., 1997, 2000, 2001 und Bienengraber et al., 1998). Für die Aminosäure-mutierten hUCPs sind die Daten für die Protonen- und

Anionentransportgeschwindigkeiten sowie ihre Nucleotidbindungsstärke prozentual im Verhältnis zum Wildtyp in Tab. 4-1 aufgeführt.

Tabelle 4-1

Protonen- und Anionentransportgeschwindigkeiten sowie Nucleotidbindungsstärke der Mutanten, prozentual ins Verhältnis zum jeweiligen Wildtyp (= 100 %) gesetzt.

Protein	H⁺-Transport-aktivität [%]	Cl⁻-Transport-aktivität [%]	GDP-Bindung [%]
hUCP3-wt	100	100	100
hUCP3-D28N	37	83	100
hUCP3-D164N	70	64	100
hUCP3-E173Q	94	29	79
hUCP3-D164N+E173	100	72	46
hUCP3-R95T	100	37	83
hUCP3-R188Q	92	45	56
hUCP3-R282Q	87	53	32
hUCP2-wt	100	100	100
hUCP2-R96T	85	44	100

4.3.4.1. D28N von hUCP3

Der bei allen UCP-Isomeren vorkommende Säurerest D28 in der ersten Helix von hUCP3 wurde neutralisiert, da bei vielen anderen H⁺-transportierenden Proteinen Säuregruppen innerhalb der Membranhelices beteiligt sind. Bei UCP3-D28N ist ausschließlich die H⁺-Transportaktivität ohne Beeinflussung des Chloridtransportes oder der Nucleotidbindungsstärke vermindert. Die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der beiden Transportarten lässt bei D28N auf eine geringere Affinität bei niedrigen Konzentrationen schließen als beim Wildtyp, andererseits ist die Hemmung von D28N bei hohen Nucleotidkonzentrationen stärker ausgeprägt. D28N ließ sich in niedrigeren Konzentrationen als der Wildtyp in den Vesikel für den H⁺-Transport einbauen, was auf eine Instabilität der Proteinstruktur hindeutet. Nach diesen Resultaten könnte die Aminosäure D28 von hUCP3 sowohl am H⁺-Transport durch UCP als auch an der Stabilisierung der Proteinstruktur beteiligt sein. Möglicherweise wird ein Proton von der Fettsäure auf die Carboxylgruppe von D28 übertragen. Jedoch ist der Mechanismus der Ionentranslokation durch UCP3 sowie die Kontrolle durch Purinnucleotide und freie Fettsäuren noch zu wenig erforscht.

Ähnliches ergab sich für die Mutante D27N mit isoliertem *S. cerevisiae* exprimiertem, nativem haUCP1 (Echtay et al., 2000), so dass die Ergebnisse, die für natives UCP1 aus

Nagetieren gefunden wurden, auf UCP3 weitestgehend übertragbar sind und beide Proteine wahrscheinlich über eine ähnliche Regulation des H^+ -Transfers verfügen. Die AG Klingenberg hatte auch das Membranpotential an isolierten Hefemitochondrien mit haUCP1-D27N gemessen und dabei keine Veränderungen registriert (Echtay et al., 2000). Stattdessen fiel die *S. cerevisiae*-Expression von eingebauter D27N in den Mitochondrien sehr niedrig aus, was auf eine nicht native Faltung von UCP1 schließen lässt. Winkler und Klingenberg (1994) schlugen vor, dass Fettsäuren als prosthetische Gruppe für den H^+ -Transport agieren und ihre Carboxylgruppe das Proton an eine Carboxylgruppe einer Aminosäure von UCP liefert, damit stellen Asparagin- und Glutaminsäure die bevorzugten Elemente für den H^+ -Transfer quer durch die Membran dar. Außerdem ist die Ionisierung einer Carboxylgruppe für die Regulation der Purinnucleotidbindung wichtig (Klingenberg, 1988).

Eine ähnliche Verminderung der Transportaktivität einhergehend mit einer Destabilisierung der Proteinstruktur wurde auch bei AAC2 (K38, Müller et al., 1997) und P_iC (H32, Phelps et al., 1996; D39, Phelps et al., 2001) vermerkt. Bei Bildung einer Doppelmutanten D39+E137 des Phosphatcarriers zeigte sich, dass die Transportaktivität wieder zurückgewonnen werden konnte, jedoch die Stabilität des zurückgefalteteten Proteins beeinträchtigt war. Phelps et al. (2001) vermuteten, dass D39 nicht essentiell für den Phosphattransport ist, sondern an der Stabilisierung der Proteinstruktur beteiligt ist.

4.3.4.2. D164N, E173Q und D164N+E173Q von hUCP3

Zwischen der 3. und 4. Helix auf der Matrixseite von UCP befinden sich verschiedene geladene Aminosäuren, die im Fall von nativem haUCP1 in Verbindung mit dem Protonen- und Anionentransport gebracht wurden (Bienengräber et al., 1998; Echtay et al., 2001). Dementsprechend wurden analoge Reste von hUCP3, D164N und E173Q einzeln und als Doppelmutante neutralisiert. Dabei ist die Aminosäure D164 interessant, weil sie nicht in UCP1, hUCP2 oder einem anderen mitochondrialen Carrier vorkommt, sondern nur in mUCP2 und mUCP3 sowie in hUCP3. D164 ist nicht Teil einer transmembranen Helix, sondern liegt in dem Matrix-,Loop', in welchem die Neutralisation zweier Histidinreste H145+H147 von haUCP1 (Bienengräber et al., 1998) zu einer vollkommenen H^+ -Transportinaktivierung geführt hatte.

Sowohl beim Protonen- als auch beim Anionentransport wies D164N von hUCP3 eine um ca. 30 % verminderte Aktivität gegenüber dem Wildtyp auf, die Bindung und Hemmung durch Nucleotide änderte sich nicht. Ähnlich der Aminosäure D28 könnte auch die Carboxylgruppe

von D164 am H^+ -Transfer beteiligt sein. D164 könnte dabei mit den in der Nähe liegenden Aminosäuren H149, D156 und K158 in Verbindung stehen, die möglicherweise wie die beiden Histidine H145 und H147 in haUCP1 direkt in den Protonentransport integriert sind. Aus dem geringen Proteineinbau ist zu schliessen, dass die Aminosäure vorrangig zur Stabilisierung der Proteinstruktur beiträgt, möglicherweise durch Bildung einer Ionenbrücke von D164 mit R166 im hydrophilen ‚Loop‘ oder den intrahelicalen Resten R95 oder R188, die den Chloridtransport beeinflussen. Für eine Destabilisierung der Proteinstruktur von hUCP3 sprechen auch die eher gering ausfallenden Abnahmen der beiden Transportaktivitäten durch UCP. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass im Phosphatcarrier an ähnlicher Stelle in der Aminosäuresequenz ein Serin gegen Threonin ausgetauscht und eine Inaktivierung des Proteins und nicht des Phosphattransportes festgestellt wurde. Dies deutet auf eine funktionelle Relevanz der Hydroxylgruppe von Serin für den Phosphattransportweg hin (Phelps et al., 2001).

Die Neutralisation der sauren Aminosäure E173 in hUCP3, die 9 Aminosäuren in C-terminaler Richtung von D164 entfernt liegt, ist interessant, da die entsprechende Aminosäure E167 von haUCP1 am Chloridtransport beteiligt ist (Echtay et al., 2000) und E173 ein saurer Rest E172 und ein basischer Rest R171 vorgelagert sind.

Durch Eliminierung des sauren Restes von E173 wurde der Protonentransport samt Inhibierung als auch die Nucleotidbindung nicht beeinflusst. Stattdessen wurde der Cl^- -Transport stark vermindert. Für die Mutante E167Q von haUCP1, in *S. cerevisiae* exprimiert, konnte die AG Klingenberg ähnliche Ergebnisse erhalten (Echtay et al., 2000), was auf Gemeinsamkeiten zwischen UCP1 und 3 beim Mechanismus schließen lässt und zeigt zusammen mit den Resultaten für die Mutante D28N, dass bei beiden Proteinen der Protonen- und der Chloridtransport voneinander unabhängig sind. Demnach gibt es entweder zwei getrennte Kanäle für die beiden Transportarten oder verschiedene Bedingungen für die innerhalb eines gemeinsamen Weges teilnehmenden Aminosäurereste. Durch die Trennung des Protonentransportes vom Anionentransfer wird auch ein H^+ -Transportmechanismus über einen Fettsäureanionen-Cyclus, nach dem von Garlid (Garlid et al., 1996) vorgeschlagenen Modell unwahrscheinlich. E173 liegt in einem ‚intramembranen Loop‘, der nach Aquila et al. (1985) einen wässrigen Kanal darstellt und eine Pore für den Chloridtransport mitbilden könnte. Über Liganden-abhängige Chloridkanäle kann die Beteiligung der Carboxylgruppe in den Cl^- -Transport erklärt werden. Außerdem wechselwirkt deren Hydroxylgruppe mit Wassermolekülen und fördert dadurch die Dehydratisierung von Chloridionen (Barnard et al., 1987; Cattrell et al., 1988). Dafür spricht auch, dass der Gehalt an Serin und Threonin in allen UCPs

sehr hoch ist. Eine Erklärung für die direkte Beteiligung von E173Q am Anionentransport wird unter Kap. 4.3.3.4. dargelegt. Ähnliche Ergebnisse erhielten Phelps et al. (1996), die beim Hefe-Phosphatcarrier bei Mutation von E164, das in hUCP3 E173 entspricht, eine starke Abnahme der Transportaktivität registrierten.

Durch die Neutralisation von E173 wurden nur 70 % der Cl^- -Transportaktivität in hUCP3 gehemmt, im Gegensatz zu E167Q von haUCP1, das eine 92 % hohe Inhibierung erzeugte. Diese Differenz von 20 % kann zum einen an dem noch vorhandenen sauren Rest E172 liegen, der entweder den Chloridtransport mitbeeinflusst oder aber eine Ionenbrücke zur Stabilisierung des Loops mit R171 bildet, möglicherweise im Wechsel mit E173.

Durch die Eliminierung der beiden sauren Reste D164 und E173 (Doppelmutante) nimmt die Bindung von Nucleotiden stark ab und parallel dazu ist keine Hemmung des H^+ - und des Cl^- -Transportes zu beobachten. Allerdings verfügte D164N+E173Q über einen dem Wildtyp entsprechenden Protonen- und einen nur um 28 % niedrigeren Chloridtransport. Da bei den beiden Einzelmutanten keine Beeinflussung der Nucleotidbindung vorlag, kann eine Beteiligung der Doppelmutanten an der Bindungsreaktion ausgeschlossen werden. Stattdessen scheint die Faltung im Bereich der Nucleotidbindungsstelle so beeinflusst zu sein, dass der Transport GDP- und GTP-insensitiv ist. Möglicherweise sind die beiden sauren Reste auch an der Stabilität der UCP3-Proteinstruktur beteiligt. Ähnliche Ergebnisse konnten Phelps et al. (2001) mit den Doppelmutationen von D39+E192 sowie E137+E192 des Phosphatcarriers beobachten, welche die inhibierende Wirkung der Einzelmutationen auf die Phosphattransportaktivität wieder aufhoben. Nach Phelps et al. (2001) sind die sauren intrahelicalen Reste D39 und E137 in Zusammenhang mit E192 an den Bewegungen der Helices des P_iC zur Phosphat-Übertragung quer der Membran beteiligt. Auch von Heimpel (1999) konnte eine teilweise Wiedererlangung der Aktivitäten durch Einführung von Doppelmutationen in den AAC beobachtet werden, was auf Renaturierungsunterschiede zwischen der Mutante und dem Wildtyp zurückgeführt wurde.

4.3.4.3. R95T, R188Q und R282Q von hUCP3 sowie R96T von hUCP2

Es ist bekannt, dass Arginine an der Bindungsstelle mehrerer Enzyme und Proteine anwesend sind, um Substrate zu binden (Riordon et al., 1977). Ähnlich wie bei haUCP1, dessen intrahelicale Arginine zum Teil an der Nucleotidbindung von UCP beteiligt sind, wurde auch für hUCP2 und 3 eine mögliche Beteiligung der intrahelicalen basischen Reste an der Nucleotidbindung angenommen. Drei der vier intrahelicalen Arginine R87, R188 und R282 für hUCP3

sind in allen Carriern konserviert und befinden sich jeweils in der zweiten Helix jeder Domäne, während R95 in hUCP3 bzw. R96 in hUCP2 nur in UCP und dem Oxoglutarat-Malat-Carrier vorkommen und in der zweiten Helix der ersten Domäne liegen.

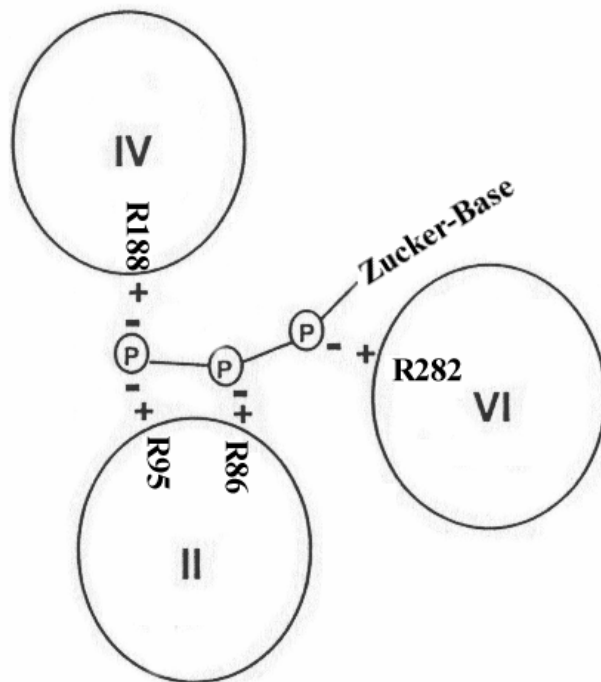
Bei den Mutanten R95T von hUCP3 und R96T von hUCP2 veränderte sich der Protonentransport samt Inhibierung durch GDP bzw. GTP sowie die Nucleotidbindungsstärke gegenüber dem Wildtyp nicht. Allerdings wurde der Chloridtransport von UCP3-R95T um 63 % und von UCP2-R96T um 56 % inaktiviert und konnte durch Purinnucleotide kaum gehemmt werden. Die Aminosäuren R96 von hUCP2 und R95T von hUCP3 scheinen essentiell für den Chloridtransport zu sein. In etwas geringerem Ausmaß inhibierten die anderen zwei Mutationen R188Q und R282Q den Anionentransfer durch UCP3, R188Q zu 55 % und R282Q zu 47 %. Dabei war die Affinität gegenüber GDP oder GTP bei den Mutanten R188Q und R282Q niedriger. Bei der Rekonstitution von R188Q und R282Q in Liposomen für den Cl⁻-Transport wurden nur geringe Mengen an Protein eingebaut, was wahrscheinlich auf Probleme bei der Renaturierung zurückgeführt werden kann. Demnach könnten die Arginine R188 und R282 an der Proteinstabilität von hUCP3 beteiligt sein und den Chloridtransport über mögliche Ionenbrücken zu sauren Resten beeinflussen.

Anders verhielt es sich bei dem in *S. cerevisiae* exprimierten, nativen haUCP1, dessen jeweilige Neutralisation von R83, R91, R182 und R276 nur im Fall von R83 und R91 eine Beteiligung am Anionentransport zeigte (Echtay et al., 2001). Durch Proteinüberexpression werden Chloridkanäle häufig in Antwort auf Proteinüberexpression aktiviert (Strange, 1998; Clapham, 1998). Dies könnte bedeuten, dass haUCP1, das in Hefe hochexprimiert worden war, einen UCP-unspezifischen Chloridkanal besaß und somit keine Beteiligung durch die Aminosäuren R182 und R276 am Anionentransfer beobachtet wurde. In anderen Carriern wie dem Oxoglutarat-Malat-Carrier und dem Phosphatcarrier führte ein Austausch von R96 durch Lysin zu einer drastischen Verminderung der Transportaktivität (Phelps, et al., 1996). Während beim AAC die Neutralisation eines zu R282 homologen Arginins kaum eine Hemmung der Aktivität verursachte (Müller et al., 1996; Heidkämper et al., 1996). Zu bedenken ist auch, dass Argininreste wichtig für die Anionentranslokation bei Säugetierkanälen sind, insbesondere beim cystischen Fibrose-transmembranen-Leitfähigkeitsregulator (Sheppard et al., 1993) und dem inhibierenden Glycinrezeptor (Shiang et al., 1993).

Kürzlich wurden von Dutzler et al. (2002) für die ersten Anionenkanäle, zwei prokaryontische Chloridkanäle ClC, die Kristallstruktur analysiert. Dabei resultierten für die Homodimere pro Untereinheit eine Pore und jede Untereinheit hatte ein sich wiederholendes Muster, das in der Membran eine gegensätzliche Orientierung hatte. Über Ionenbrücken in größerer Entfernung

waren auch Arginine an der Cl^- -Translokation beteiligt. Vorrangig nehmen partielle Ladungen am Chloridtransport teil, d. h. nicht geladene, polare Aminosäuren stabilisieren die Cl^- -Ionen. Dutzler et al. beobachteten auch, dass ein saurer Rest an der Chloridbindungsstelle beteiligt ist und spekulierten, dass diese saure Seitenkette als ein ‚Tor‘ für den Transport agiert und ausschwingt, um das ‚Tor‘ zu öffnen. Die Bewegung der Seitenkette könnte durch elektrostatische Repulsion ermöglicht werden, wenn ein Chlorid-Ion in die Pore eintritt. Diese saure Aminosäure könnte im Fall von UCP3 E173 und im Fall von UCP2 E172 darstellen.

Der Protonenfluss durch UCP3 wurde, wie oben schon für R95T erwähnt, durch die Mutationen R188Q oder R282Q nicht verändert. Jedoch wurde die Inhibierung des H^+ -Transportes kaum durch ADP oder ATP gehemmt. Genauso wurde die Bindungsaffinität durch Purinnucleotide an UCP3 sehr stark gesenkt, im Fall von R188 zu 44 % mit ATP und zu 31 % mit ADP, von R282 zu 59 % mit ATP und zu 68 % mit ADP. Diese Ergebnisse besagen, dass der H^+ -Transport und die Nucleotidinhibierung als auch Bindung getrennte Eigenschaften von UCP1 und 3 sind und zwei getrennte Reaktionsorte im Protein bedeuten, wie auch für haUCP1 schon mehrere Hinweise gefunden wurden (Klingenberg, 1984; Kopecky et al., 1987; Katiyar und Shrago, 1989; Echtay et al., 2001). Die Hemmung des Protonentransportes und die Bindung von R188Q und R282Q gleichen den entsprechend neutralisierten Aminosäuren R83, R182 und R276 in nativem haUCP1 (Echtay et al., 2001). Nur ist der absolute Verlust der Nucleotidbindung bei R182Q und R276Q von haUCP1 mit niedrigeren Nucleotidkonzentrationen als bei R188Q und R282Q von hUCP3 erreicht. Gründe für diese Differenz innerhalb der mutierten Arginine zwischen UCP1 und 3 können Rückfaltungsprobleme der *E. coli* exprimierten Inclusion Bodies sein, wie bereits unter Kap. 4.2.2. diskutiert wurde. Eindeutig ist jedoch, dass R188 und R282 essentiell für die Nucleotidbindung an hUCP3 sind und nicht am Protonentransport teilnehmen. Aus Photoaffinitätsmarkierungsversuchen von Mayinger und Klingenberg (1992) an haUCP1 wurde erkannt, dass R276 in der Nucleotidbindungstasche der dritten Domäne von UCP1 lokalisiert ist und dies auch auf R282 übertragbar ist. Modriansky et al. (1997) behauptete dagegen, dass die Arginin R276-Mutante eine normale Nucleotidbindung ausführte, aber keine Inhibierung des H^+ -Transportes durchführte. Von der AG Klingenberg (Klingenberg, 2000) wurde ein Mechanismus für die Beteiligung der Arginine an der Nucleotidbindung in haUCP1 entwickelt, nach dem alle vier intrahelicalen Arginine R83, R91, R182 und R276 sowie die sauren Reste E190 und H214 beteiligt sind, wobei für R91 eine pH-abhängige Beeinflussung der Nucleotidbindung festgestellt wurde.

**Abbildung 4-1**

Ein mögliches Nucleotidbindungsmodell für hUCP3. Es beruht auf dem von der Arbeitsgruppe Klingenberg entwickelten Modell für die Phosphatbindungstasche in UCP1 (Echtay et al., 2001). Durch Protonierung von E196 in hUCP3 würde sich die Phosphatbindungsstelle öffnen. Die dadurch freiliegenden Arginine R86 und R188 binden entweder an den endständigen Phosphatrest des Nucleosiddiphosphats oder an die β - bzw. γ -Phosphatladung des Triphosphats. Durch die Protonierung der H220 könnte R95 an die zweite Ladung des γ -Phosphats des Triphosphats binden. Auf Grund dieser Wechselwirkungen würde sich das gebundene Nucleotid, zusammen mit seinem Zucker-Basen-Rest in eine feste Bindung am N-Terminus der 6. Helix schieben. Dabei würde eine Änderung der Konformation am C-Terminus der 6. Helix bewirkt werden, wenn R282 an den α -Phosphat bindet.

Dabei bilden die vier intrahelicalen Arginine eine Phosphat-Bindungstasche in UCP1. Die Aminosäuren His-214 und E190 sind in allen UCP-Varianten konserviert und an der pH-Regulation der Bindung von UCP1 beteiligt (Echtay et al., 1998). Dieses Bindungsmodell könnte in seinen Grundzügen für UCP3 und möglicherweise auch für UCP2 gelten, das in seinem Bindungsverhalten sehr stark UCP1 entspricht. In Abb. 4-1 ist das für UCP3 mögliche Bindungsmodell im Detail dargestellt.

Berücksichtigt werden muss, dass die Bindung für hUCP3 sowie das Bindungsverhalten von Purinnucleosiddi- zu -triphosphaten unterschiedlich zu UCP1 und UCP2 ist und damit ein etwas anderer Mechanismus für die Nucleotidbindung an UCP3 zu Grunde liegt.

4.4. Physiologische Funktionen der humanen Uncoupling Proteine

Alle drei humanen Uncoupling Proteine können Protonen und Anionen unabhängig voneinander transportieren. Diese Ionenflüsse werden durch Purinnucleotide inhibiert. Dabei benötigt der H^+ -Transport zu seiner Aktivierung zwei Cofaktoren, Fettsäuren und CoQ_{10} . Für hUCP1 konnte die Protonenleitfähigkeit und ihre Inhibierung durch Purinnucleotide an He-femitochondrien mit eingebautem nativen UCP1 und an *E. coli* exprimierten, renaturierten

und in Liposomen rekonstituierten IB-UCP1 nachgewiesen werden. Demnach konnten die Inclusion Bodies von UCP1 in eine weitestgehend native Konfiguration zurückgefaltet werden und IB-hUCP2 und IB-hUCP3, die ähnlich wie IB-hUCP1 aktiviert werden konnten, besitzen wahrscheinlich auch eine native Konfiguration. Dafür sprechen weiterhin die Aminosäureübereinstimmungen und die ähnlichen Reaktionen auf Mutationen in UCP3 und nativem haUCP1. Somit ist das *E. coli*-Expressionssystem für die Funktionsuntersuchungen der humanen Uncoupling Proteine hervorragend geeignet, in dem die drei Proteine in hohen Konzentrationen als Inclusion Bodies anfielen.

Des weiteren zeigen hUCP1 und hUCP2 eine pH-Regulation der Nucleotidinhibierung des Protonenflusses, die wahrscheinlich auch für hUCP3 angenommen werden kann. Echta et al. (2001) entdeckten an Hand der in Hefemitochondrien vorliegenden Arginin-Mutanten (R83Q, R91T, R182Q und R276Q) eine intrazelluläre Regulation des Protonentransportes durch Fettsäuren für haUCP1. Dabei fehlen den Hefezellen endogene freie Fettsäuren, weil die Arginin-Mutanten in Abwesenheit von Nucleotiden ohne Fettsäuren inaktiv waren. Die Bindung durch Nucleotide an UCP erfolgt mit freiem, d. h. mit nicht Mg^{2+} -gebundenen Nucleotiden und vermutlich unterliegen die hUCPs durch Fettsäuren und Nucleotide einer ähnlichen Kontrolle. Bei höheren Konzentrationen an freien Fettsäuren zeigte sich auch eine unspezifische Entkopplung der Atmung für hUCP1-haltige Hefemitochondrien. Des weiteren weist die große Ähnlichkeit zwischen den Ergebnissen der hUCP3- und haUCP1-Arginin- und Aspartat-Mutanten sowie die Aminosäureübereinstimmungen zwischen haUCP1 und hUCP1, 2 und 3 auf eine intrazelluläre Regulation des Protonenflusses durch Fettsäuren hin. Dagegen beobachtete die AG Garlid für die UCP1-gebundene Entkopplung keine Regulation durch Fettsäuren (Modriansky et al., 1997; Gonzalez-Barroso et al., 1998).

Für die H^+ -Leitfähigkeit durch UCP1 aus Hamster sind nach Bienengraber et al. (1998) zwei Histidine auf der Matrixseite essentiell, H145 und H147, an deren entsprechender AS-Sequenz in hUCP2 und hUCP3 jeweils nur eine basische Aminosäure liegt, R153 in hUCP2 und H149 in hUCP3. In dieser ‚Loop‘-Region zwischen dritter und vierter Helix befinden sich jedoch in nächster Nähe weitere geladene Aminosäuren wie R158, R159 in hUCP2 und R154, D156, R157 und K158 in hUCP3, die möglicherweise am Protonentransport ähnlich den Histidinen in haUCP1 beteiligt sind. Bei der F-ATPase, einer mitochondrialen ATP-abhängigen Protonenpumpe konnte durch Mutagenese eine Beeinflussung des Protonentransfers durch geladene saure und basische Reste festgestellt werden. Dabei wechselwirkt ein Arginin direkt mit einem Aspartat als Teil des H^+ -Cyclus und ein Histidin mit einem Glutamat als Teil eines wässrigen Kanals, über den Protonen zum Aspartat gelangen (Fillingame et al., 2000;

Vik et al., 2000; Cain et al., 1988). Dementsprechend könnte der wässrige Kanal bei hUCP2 und hUCP3 in der ‚Loop‘-Region zwischen dritter und vierter Helix liegen und mit der am Protonentransport beteiligten Aminosäure D28 zum H^+ -Transfer wechselwirken.

Aus den Ergebnissen für die Arginin-Mutanten von hUCP3 kann von einem ähnlichen Mechanismus der Purinnucleotidbindung an hUCP3 ausgegangen werden wie dem in Kap 4.3.4.3. vorgestellten Bindungsmodell für haUCP1 von der AG Klingenberg (Echtay et al., 2001). Dieser Mechanismus unterliegt wahrscheinlich in seinen Grundzügen bei allen drei hUCPs wegen der in allen UCP-Varianten konservierten Aminosäuren E190 und H214, einer pH-Regulation, wie sie für haUCP1 bereits notiert worden ist. Allerdings benötigen hUCP2 und 3 für die Hemmung des H^+ -Transportes höhere Nucleotidkonzentrationen als hUCP1, was möglicherweise auf einen anderen Reaktionsablauf der Nucleotidbindung deutet, bei der ein Konformationswechsel (‚tight conformation‘) erfolgt. Demnach könnten bei der ‚tight conformation‘ bei hUCP1 andere Aminosäuren beteiligt sein als bei hUCP2 und 3, was wiederum auf unterschiedliche Regulationen der Hemmung des H^+ -Transportes bei den hUCPs hinweist.

Für eine unterschiedliche physiologische Regulation spricht auch das ADP/ ATP-Verhältnis der hUCPs, dass für hUCP3 umgekehrt zu hUCP1 und 2 liegt. Nach Echtay et al. (2001) wird der Affinitätsabfall von hUCP3 gegenüber ATP nicht nur durch die Konzentration an freiem ATP und ADP sowie den pH-Wert reguliert, sondern auch durch das Phosphorylierungspotential G_p , welches vorrangig durch das ATP/ ADP-Verhältnis bestimmt wird. Bei hUCP1 ist die Thermogenese die dominierende Funktion, die mit einer kräftigen Entkopplung und einem niedrigen G_p einhergeht. Somit ist die Aktivierung von UCP1 und möglicherweise auch UCP2 mit einer Abnahme von ATP als Inhibitor korreliert. Die Konzentration an ADP nimmt zu, da es wegen seiner geringeren Affinität weniger Hemmung verursacht. Im Skelettmuskel, dem Gewebe mit dem höchsten in-vivo UCP3-Gehalt, nimmt die Entkopplung eine untergeordnete Funktion ein und könnte eine Ergänzung zum Energiestoffwechsel der Muskelarbeit darstellen. Im aktiven Muskel wird reichlich Hitze durch die Kontraktionscyclen erzeugt und keine zusätzliche Entkopplung ist erforderlich. Somit wird UCP3 durch eine steigende ADP-Konzentration in Verbindung mit einem niedrigen ATP/ ADP-Verhältnis inhibiert. Im Ruhestand ist jedoch zusätzliche Wärme nötig, die durch Aktivierung von UCP3 erwirkt wird, das wiederum durch eine sinkende ADP-Konzentration produziert wird und damit steigt auch das ATP/ ADP-Verhältnis wieder an.

Das ATP/ ADP-Verhältnis von hUCP2 ist bei geringen Konzentrationen kleiner als das für UCP1 und könnte für UCP2 eine eher allgemeine Rolle der Entkopplung und Stoffwechsel-

inhibierung beinhalten. Eine teilweise Entkopplung würde das intramitochondriale NADH/NAD-Verhältnis vermindern und mehr NAD an die Dehydrogenase liefern, so dass die Substratoxidation nicht mehr eingeschränkt wird (Echtay und Klingenberg, 2001). Eine zusätzliche Rolle beim Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde von verschiedenen Gruppen diskutiert (Negre-Salvayre et al., 1997; Vidal-Puig et al., 2000; Pecqueur et al., 2001; Simonyan et al., 2001; Echtay et al., 2002) und als ein weiterer vorteilhafter Effekt der Funktionen aller UCPs gesehen.

Nach Sluse et al. (2002) gibt es verschiedene mögliche Funktionen für die UCPs, zum einen die Erzeugung von Wärme sowie den Schutz gegen Sauerstoffradikale als auch das Aufrechterhalten des Metabolismusgleichgewichts. Da UCP2 und UCP3 im Gegensatz zu UCP1 nur eine teilweise Entkopplung erzeugen, kann die Thermogenese nicht synonym mit ihrer Wärmeproduktion gesetzt werden. Nach Vermutung der AG Ricquier (Pecqueur et al., 2001) könnten UCP2 und 3 bei Überexpression an der Kontrolle der Immunantwort, Schutz vor der ROS-Bildung und der Insulinsekretion beteiligt sein. Dafür sprechen auch Versuche von Larsen und Clarke (2002), die mit *C. elegans* eine Diät unter CoQ₁₀-Mangel durchführten, die wahrscheinlich zusammen mit Insulin-ähnlichen Signalwegen die Produktion von ROS beeinflusste. Möglicherweise läuft dieser Weg über die Aktivierung der UCPs ab und damit wird durch Vermindern des oxidativen Schadens die Lebensdauer gesteigert.

Der Chloridtransport, der sehr viel langsamer als der Protonentransport abläuft, ist unabhängig von diesem, jedoch in seiner Funktion bisher nicht geklärt. Zwei Chloridkanäle der ClC-Familie wurden kürzlich strukturanalytisch aufgeklärt. Demnach zeichnen sich Protonen- und Anionentransporte durch verschiedene Strukturen innerhalb eines Proteins aus (Jentsch, 2002; Dutzler et al., 2002). Ähnlich UCP besitzt auch der AAC einen Anionenkanal mit hoher Leitfähigkeit und geringer Spezifität (Brustovetsky und Klingenberg, 1996). In BAT-Mitochondrien wurde durch abwechselnde Kälte- und Wärmezufuhr das Anschwellen und Zusammenpressen des Volumens wahrscheinlich über einen Anionenkanal reguliert (Desautels und Himms-Hagen, 1980). Möglicherweise hat der Chloridkanal von UCP eine ähnliche Funktion und steht in Zusammenhang mit der Nucleotidbindung innerhalb der intrahelicalen Helices.

Zur genaueren Erklärung der einzelnen Funktionen der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 und der ihnen zugrunde liegenden Mechanismen sowie ihren physiologischen Auswirkungen sind noch weitere Versuche durchzuführen.

5. Zusammenfassung

1997 wurden zusätzlich zu dem bekannten Uncoupling Protein (UCP1) im braunem Fettgewebe (BAT) die humanen Uncoupling Proteine 2 und 3 (hUCP2, hUCP3) entdeckt, die in verschiedenen Geweben des Menschen vorkommen. Das klassische Uncoupling Protein 1 wird nur in den Mitochondrien des BAT produziert. In den Mitochondrien von Nagetieren und Winterschläfern fungiert es als H^+ -Transporter der inneren Mitochondrienmembran und entkoppelt die Atmung von der oxidativen Phosphorylierung für die Thermogenese. Dieser H^+ -Transport wird durch freie Fettsäuren in Gegenwart von Ubichinon CoQ_{10} aktiviert und durch Purinnucleotide inhibiert. Im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse für UCP1 aus Nagetieren, insbesondere Hamster-UCP1 (haUCP1), wurden die Funktionen von hUCP2 und 3 im Vergleich mit dem humanen Uncoupling Protein (hUCP1) untersucht.

Alle drei hUCPs wurden in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. An isolierten Hefemitochondrien wurde die Entkopplung und Hemmung durch Purinnucleotide anhand des Membranpotentials bestimmt. Die Nucleotidinhibierung stellt das spezifische Merkmal für die UCP-Aktivität dar. Da mit der herkömmlichen Methode zur erfolgreichen Hefeexpression von haUCP1 die hUCPs nur in sehr geringen Mengen in die Mitochondrien eingebaut werden konnten, wurden zur Verringerung der Proteinaggregatbildung verschiedene Zellanzuchtparameter variiert, wie z. B. die Änderung der Galactose-Konzentration für die Induktion. Mit den veränderten Anzuchtbedingungen konnten alle drei exprimierten humanen Uncoupling Proteine durch Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Trotz hoher Expression aller drei hUCPs erfolgte der Einbau in die Mitochondrien unterschiedlich: hUCP1 wurde fast vollständig eingebaut, dagegen hUCP2 nur in sehr geringem Maße und hUCP3 nur in Spuren. Entsprechend fielen die Entkopplungen der Hefemitochondrien mit eingebautem UCP aus. Die hUCP1-haltigen Mitochondrien wurden mit Fettsäure fast vollständig entkoppelt und diese Entkopplung wurde durch Zugabe von Purinnucleotiden in gleichem Maße wieder gehemmt. Diese Aktivität von hUCP1 war pH-abhängig und entspricht dem Verhalten von nativem haUCP1. Dagegen wiesen die hUCP2-enthaltenden Mitochondrien nur eine teilweise Entkopplung auf, die ähnlich wie bei hUCP1 durch GTP stärker als durch GDP inhibiert wurde. Mit hUCP3 zeigte sich eine mittlere Entkopplung der Mitochondrien, die nur in sehr geringem Ausmaß inhibiert werden konnte. Da allerdings das meiste hUCP2 und hUCP3 nicht in die Hefemitochondrienmembran eingebaut wurde, können mit dem Hefeexpressionssystem die hUCP2 und hUCP3-Funktionen nicht näher untersucht werden.

Deshalb wurden die hUCPs in *Escherichia coli* mit einem IPTG-induzierbaren pET24a-Vektorsystem exprimiert, wo sie sich in hohen Mengen in Form von Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies, IB) ablagerten. Zur Bestimmung des Transports von H^+ und Cl^- sowie deren Nucleotidinhibition wurden die IB-hUCPs zuerst renaturiert. Dazu wurden sie mit dem anionischen Detergens N-Laurylsarcosin (Sarkosyl) solubilisiert und in einem zweiten Schritt wurde Sarkosyl gegen das neutrale Detergens Digitonin über eine Dialyse ausgetauscht. Anschließend erfolgte zur vollständigen Entfernung des Sarkosyls eine Dowex-Behandlung. Als Kriterium für die Faltung der hUCPs in eine aktive Konfiguration wurde die Nucleotidbindung mit fluoreszierendem Dansyl-GTP und -GDP gemessen. Alle drei humanen Uncoupling Proteine wiesen eine Bindung mit Purinnucleotiden auf.

Für die Transportmessungen wurden die renaturierten hUCPs unter Verwendung des neutralen Detergens $C_{10}E_5$ und Amberlite in Phospholipidvesikeln rekonstituiert. Die in Liposomen eingebauten humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 zeigten Protonen- und Chloridtransport, der durch Purinnucleotide inhibiert werden konnte. Für den Protonentransport der hUCPs ist der Zusatz von Ubichinon und freien Fettsäuren als Cofaktoren notwendig. Bei der Hemmung des Protonenflusses ergab sich für hUCP1 und 2 eine stärkere Inhibition durch GTP als GDP, während es sich bei hUCP3 umgekehrt verhielt. Das unterschiedliche Verhalten gegen Nucleotide von hUCP3 zu hUCP1 und 2 kann vor allem auf die Funktion im Skelettmuskel zurückgeführt werden. Hier wird eine Thermogenese durch Entkopplung im Ruhezustand bei hohem ATP/ADP-Verhältnis erforderlich, während bei Muskelaktivität ein höherer ADP-Spiegel UCP3 blockiert. Da die Transportgeschwindigkeiten durch UCP sich ähnlich wie die von nativem hUCP1 verhalten, stellt das *E. coli*-Expressionssystem eine erfolgreiche Alternative zum Hefeexpressionssystem zur Ermittlung der Transportfunktionen der hUCPs dar.

Zur Bestimmung der Beziehung zwischen Primärstruktur und Funktion von hUCP2 und insbesondere von hUCP3 wurden einzelne geladene Aminosäuren durch Mutagenese substituiert. Die Aminosäuren sind nach den drei Funktionen von UCP und der Stabilität der Proteinstruktur klassifiziert:

- (1) Durch Neutralisation der Asparaginsäure D28, die in der zweiten transmembranen Helix von hUCP3 liegt, wurde der H^+ -Transport von D28N deutlich inhibiert. Dagegen blieben der Anionentransport und die Nucleotidbindung unverändert. D28 ist am H^+ -Transport durch die innere Mitochondrienmembran von UCP3 beteiligt.
- (2) Die Neutralisation der intrahelicalen Arginine von hUCP2 (R96) und hUCP3 (R95) sowie der Glutaminsäure (E173 von hUCP3) im ‚Loop‘ auf der Matrixseite führte zur Inaktivierung

des Cl^- -Transportes. Dabei war vor allem bei R95T und E173Q (hUCP3) sowie bei R96T (hUCP2) der Cl^- -Transport vermindert, was auf eine direkte Beteiligung von R95, E173 bzw. R96 am Anionentransport hinweist. E173 von hUCP3 könnte als ein ‚Tor‘ für den Cl^- -Transport agieren.

(3) Die Bindung von Nucleotiden an hUCP3 wurde durch den Austausch der intrahelicalen Argininreste (R188, R282) eingeschränkt und entsprechend verringerte sich auch die Inhibierung der Transportfunktionen durch Purinnucleotide. R188 und R282 sind somit direkt an der Nucleotidbindung mit hUCP3 beteiligt.

(4) Durch Neutralisation der auf Matrixseite im ‚Loop‘ vorkommenden Asparaginsäure D164 von hUCP3 wurde der H^+ - und Cl^- -Transport leicht inaktiviert. Auch bei den Mutationen R188Q und R282Q von hUCP3 gab es eine schwache Verminderung des Cl^- -Transportes. Möglicherweise sind diese Aminosäuren durch Ionensalzbrücken an der Stabilisierung der Proteinstruktur beteiligt. Durch die Neutralisation der beiden sauren Reste D164N+E173Q blieb der H^+ - und Cl^- -Transport weitestgehend unberührt, jedoch wurden die Nucleotidbindung und Transporthemmung stark eingeschränkt. Auf Grund des Mangels zweier saurer Reste konnte die Doppelmutante D164N+E173Q nicht korrekt gefaltet werden.

Durch diese Mutagenese konnten für den Protonen- und Anionentransport sowie die Nucleotidbindung die Beteiligung bestimmter geladener Aminosäurereste nachgewiesen werden. Diese Differenzierung der Aminosäure-Funktionen weist erstmalig auf Gemeinsamkeiten bei den Transport-Mechanismen der UCP-Isoformen hin. Die Resultate unterstützen auch die Vermutung, dass Protonen- und Anionentransport voneinander unabhängig sind, was einem Protonentransport-Mechanismus durch einen Fettsäureanionencyclus widerspricht. Außerdem lassen der H^+ -Transport und die Nucleotidinhibierung sowie -bindung sich verschiedenen Bereichen in den hUCPs zuordnen.

6. Abkürzungen

AAC	ADP/ATP-Carrier
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATCG	Adenin, Thymidin, Cystein, Guanin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
C ₁₀ E ₅	N-Decylpentaoxyethylen/ Pentaethylenglykol-monodecylether
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon
cmc	kritische Micellenkonzentration
CoQ ₁₀	Ubichinon
DisC ₃	Diethylpyrocarbonat
D	Asparaginsäure
DANS-GTP	Dansyl-GTP/ 2'-O-[5-(dimethylamino) naphthalen-1-sulfonyl]-GTP
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTE	Dithioerythriol
E	Glutaminsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis (β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ΔF	spezifische Fluoreszenz
FA	Fettsäure
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
haUCP	UCP von Hamster
hUCP	humanes UCP
HEPES	N-(2-hydroxyethyl) piperazin-N-ethansulfonsäure
IB	Inclusion Bodies
IB-UCP	aus Inclusion Bodies isoliertes Uncoupling Protein
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
K	Lysin
LB	Hefeextrakt/Trypton-Medium für E. coli

MES	2-(N-morpholino) ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mQAE	N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium-bromid
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N	Asparagin
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (hydrierte Form)
OD	optische Dichte
OGMC	Oxoglutarat/Malat-Carrier
PBS	Natriumchlorid-Phosphatpuffer
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _i C	Phosphatcarrierprotein
PIPES	1,4-piperazin-diethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pyranin	8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure-trinatriumsalz
R	Arginin
rpm	repeats per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sarkosyl	N-Dodecanyl-N-methylglycin (N-Laurylsarcosin) Natriumsalz / -
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Natriumchlorid-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TFB1/TFB2	Transformationspuffer
TIM	Translokationssystem d. inneren Mitochondrienmembran
TOM	Translokationssystem d. äußeren Mitochondrienmembran
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit(s)
UCP	Uncoupling Protein
UCP1, 2, 3 oder 4	Isoformen des UCP
Val	Valinomycin
WT	Wildtyp (d.h. nicht mutiertes Protein)
YPD	Hefeextrakt-Glucose-Vollmedium

7. Literaturverzeichnis

Aquila, H., Link, T.A., Klingenberg, M. (1985) EMBO J., 4, 2369-2376

Aquila; H., Link, T.A., Klingenberg, M. (1987) FEBS Lett., 212, 1-9

Arechaga, I., Raimbault, S., Prieto, S., Levi-Meyrueis, C., Zaragoza, P., Miroux, B., Ricquier, D., Bouillaud, F., und Rial, E. (1993) Biochem. J., 296, 693-700.

Arsenijevic D et al. (2000) Nat. Genet., 26, 435-9.

Barnard EA, Bilbe G, Houamed K, Moss SJ, Van Renterghem C, Smart TG. (1987) Neuropharmacology, 26, 837-44

Barnes, H.J. Arlotto, M.P. und Waterman, M.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5597-5601

Bathgate, B., Reebairn, E.M., Greenland, A.J. und Reid, G.A. (1994) Mol. Microbiol. 6, 363-370

Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Trends in Cell Biol., 10, 25-31

Baumruk, F., Flachs, P., Horakova, :, Floryk, D. und Kopecky, J. (1999) FEBS Letters 444, 206-210

Bienengräber, M., Echtay, K.S. und Klingenberg, M. (1998) Biochemistry, 37, 3-8.

Bienengräber, M. (1999) Expression und Mutagenese des Uncoupling Protein-1, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität München.

Birnboim und Doly (1979) Nuc. Ac. Res., 7, 1513-23.

Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo; A., Seydoux, J., Muzzin, P. und Giacobino, J.P. (1997). FEBS Lett., 408, 39-42

Boss. O., Samec, F., Kuhne, P., Bijlenga, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Giacobino, J.P., Muzzin, P. (1998) J. Biol. Chem., 273, 5-8

Bouillaud, F., Arechaga, I., Petit, P.X., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Casteilla, L., Laurent, M., Rial, E. und Ricquier, D. (1994) EMBO, 13, 1990-1997.

Brand, M.D. (2000) Exp. Gerontol., Review, 35, 811-20

Brown, A.M., Dolan, J.W., Willi, S.M., Garvey, W.T., Argyropoulos, G. (1999) FEBS Lett., 464, 189-93

Brustovetsky N, Klingenberg M (1996) Biochem., 35, 8483

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987) BioTechniques, 5, 376-379.

- Cadenas, S., Buckingham, J.A., Samec, S., Seydoux, J., Din, N., Dulloo, A.G., Brand, M.D. (1999) FEBS Lett., 462, 257-260
- Cain BD, Simoni RD. (1988) J. Biol. Chem. 263, 6606-12.
- Cesareni, G. und Murray, J.A.H. (1987) Principles and Methods. Genetic Engineering, Seltow, J.K. Ed., Plenum Press, New York, 9, 135-154.
- Chen, P.-Y., Illsley, N.P. und Verkman, A.S. (1989) Am. J. Physiol., 254, F114-F120.
- Clapham, D.E. (1998) J. Gen. Physiol., 111, 623-24
- Clapham, J.C. et al. (2000) Nature, 406, 415-418
- Clark, J.M. (1988) Nucleic Acids Res., 16, 9677-9686.
- Clement, K., Ruiz, J., Cassard-Doulcier, A.M., Bouillaud, F., Ricquier, D., Basdevant, A., Guy-Grand, B., Froguel, P. (1996) Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord., 20, 1996, 1062-1066
- Deng, W.P. und Nickoloff, J.A. (1992) Anal. Biochem., 200, 81-88.
- Desautels M, Himms-Hagen J. (1980) Can J Biochem., 58, 1057-68.
- Dunn, S.M.J., Shelman, R.A. und Agey, M.W. (1989) Biochemistry, 255, 1-7.
- Dutzler, R., Campell, E.B., Cadene, M., Chalt, B.T., MacKinnon, R. (2002) Nature, 415, 287-294
- Echtay, K.S., Bienengräber, M. und Klingenberg, M. (1997) Biochemistry, 36, 8253-8260.
- Echtay, K.S., Bienengräber, M., Winkler, E. und Klingenberg, M. (1998) J. Biol. Chem., 38, 24368-24374.
- Echtay, K.S. (1999) Structure-Function Relationship of Uncoupling Protein (UCP-1), Dissertation, Fakultät für Pharmazie und Chemie, Universität München.
- Echtay, K.S., Liu, Q., Caskey, E., Winkler, E., Frischmuth, K., Bienengräber, M. und Klingenberg, M. (1999) EBS Lett., 450, 8-12.
- Echtay, K.S., Winkler, E., Bienengräber, M. und Klingenberg, M. (2000) Biochemistry, 39, 3311-3317.
- Echtay, K.S. + Winkler, E. und Klingenberg, M. (2000) Nature, 408, 609-613.
- Echtay, K.S., Winkler, E., Frischmuth, K. und Klingenberg, M. (2001) PNAS, 98, 1416-1421.
- Echtay, K.S., Bienengräber, M. und Klingenberg, M. (2001) Biochemistry, 40, 5243-8.
- Echtay, K.S. und Brand, M.D. (2001) Biochem. Soc. Trans., 29, 763-8
- Echtay, K.S. et al. (2002). Nature, 415, 96-99

- Fiermonte, G., Walker, J.E. und Palmieri, F. (1993) *Biochem. J.*, 294, 293-299.
- Fillingame, R.H. Jiang, W., Dmitriev, O.Y. (2000) *J. Exp. Biol.*, 203, 9-17, Review
- Fink, A.L. (1998) *Cell*, 89, 927-937
- Fischer, B., Perry, B., Summer, I., Goodenough, P. (1992) *Eng.*, 6, 593-6
- Fiske, C.H. und Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- Fleury, C. et al. (1997) *Nature Genet.*, 15, 269-273.
- Frankel, S. Sohn, R., Leinwand, L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1192-6
- Fumeron, F. et al.. (1996) *J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 20, 1051-1054
- Garlid, K.D., Orosz, D.E., Modriansky, M., Vassanelli, S. und Jezek, P. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 2615-2620
- Gimeno, R.E., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Shyjan, A.W., Gimeno, C.J., Iris, F., Ellis, S.J. Woolf, E.A., Tartaglia, L.A. (1997) *Diabetes*, 46, 900-906
- Gong., D.-W. et al. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 16251-16257
- Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Arechaga, I. Zaragoza, P., Levi-Meyrueis, C., Raimbault, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. und Rial, E. (1996) *J. Eur. Biochem.*, 239, 445-450.
- Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Levy-Meyrueis, C., Zaragoza, P., Bouillaud, F., Rial, E. (1997) *Biochem.*, 36, 10930-35
- Gonzalez-Barroso MM, Fleury C, Bouillaud F, Nicholls DG, Rial E. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 15528-32.
- Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Jimenez, M.A., Sanz, J.M., Romero, A., Bouillaud, F., Rial, E. (1999) *J. Mol. Biol.*, 292, 137-149
- Hagen, T., Zhang, C.Y., Slieker, L.J., Chung, W.K., Leibel, R.L. and Lowell, B.B. (1999) *FEBS Lett.*, 454, 201-206
- Hagen, T., Zhang, C.Y., Vianna, C.R. and Lowell, B.B. (2000) *Biochem*, 39, 5845-5851
- Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.*, 166 557-580.
- Harper, J.A., Stuart, J.A. Jekabsons, M.B. Roussel, D., Brindle, K.M. Dickinson, K., Jones, R.B. und Brand, M.D. (2002) *Biochem. J.*, 361, 49-56
- Heaton, G.M., Wagenvoord, R.J., Kemp, A., Nichollse, D.G. (1978) *Eur. J. Biochem.*, 82, 515-521

- Heidkämper, D., Muller, V., Nelson, R.D. und Klingenberg, M. (1996) *Biochemistry*, 35, 16144-16152.
- Heidkämper, D., Winkler, E., Müller, V., Frischmuth, K., Liu, Q., Caskey, T. und Klingenberg, M. (2000) *FEBS Letters*, 480, 265-270.
- Heimpel, S.M. (1999) Struktur- und Funktionsanalyse an rekonstituiertem AAC aus *Neurospora crassa*, Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität München.
- Heimpel, S., Basset, G., Odoy, S. und Klingenberg, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 11499-11506.
- Himms-Hagen, H. (1989) *Prog. Lipid. Res.*, 28, 67-115
- Hinz, W., Faller, B., Grüninger, S., Gazzotti, P. und Chiesi, M. (1999) *FEBS Letters*, 448, 57-61.
- Hinz, W., Gruninger, A., De Pover, A. und Chiesi, M. (1999) *FEBS Lett.*, 462, 411-415.
- Huang, S.G. (1994) Fluorescent Nucleotide Derivatives as Ligands for Mitochondrial Carriers, Doktorarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität München.
- Huang, S.G. und Klingenberg, M. (1995) *Eur. J. Biochem.*, 229, 718-725.
- Huang, S.G. und Klingenberg, M. (1995a) *Biochemistry*, 34, 349-360.
- Huang, S.G. und Klingenberg, M. (1996) *Biochemistry*, 35, 7846-7854.
- Illsley, N.P. und Verkman, A.S. (1987) *Biochemistry*, 26, 1215-1219.
- Jaburek, M., Varecha, M., Gimeno, R.E., Dembski, M., Jezek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L.A. und Garlid, K.D. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 26003-26007
- Jaenicke, R. Rudolph, R., Heider, I. (1981) *Biochem. Int.*, 1, 23-31
- Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Hryniewiecka, L., Sluse, F.E. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 23198-202
- Jarmuszkiewicz, W., Vercesi, A.E., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A.Z., Sluse, F.E. (2000) *FEBS Lett.*, 467, 145-9
- Jentsch, T.J. (2002) *Nature*, 415, 276-77
- Jezek, P. und Garlid, K.D. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 19303-11
- Jezek P, Costa AD, Vercesi AE. (1996) *J Biol Chem.*, 271, 32743-8.
- Jezek P, Costa AD, Vercesi AE. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 24272-8.
- Jucker BM, Ren J, Dufour S, Cao X, Previs SF, Cadman KS, Shulman GI. (2000) *J Biol Chem.*, 275, 39279-86.

- Kane, J.F. und Hartley, D.L. (1988) *Tibtech.*, 6, 95-101
- Kaplan, R.S. und Pedersen, P.L. (1985) *Anal. Biochem.*, 150, 97-104.
- Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Gremse, D.A., Wood, D.O. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270 4108-4114
- Katiyar SS, Shrago E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86, 2559-62.
- Khorana, H.G. (1993) *PNAS*, 90, 1166-1171.
- Klingenberg M. (1984) *Biochem. Soc. Trans.*, 12, 390-3
- Klingenberg, M. und Winkler, E. (1985) *EMBO J.* 4, 3087-3092.
- Klingenberg M. (1988) *Biochem.*, 27, 781-91.
- Klingenberg, M. und Appel, M. (1989) *Eur. J. Biochem.*, 180, 121-131
- Klingenberg; M. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.*, 270, 1-14
- Klingenberg, M. (1990) *Trends Biochem. Sci.*, 15, 108-112.
- Klingenberg, M. und Winkler, E. (1994) in *Molecular Biology of Mitochondrial Transport Systems* (Forte, M. and Colombini, M. Eds.), H83, 11-18, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg
- Klingenberg, M. (1999) *J. Bioenerg. Biomembr.*, 31, 419-430.
- Klingenberg, M. und Echtay, K.S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, 44995, 1-16.
- Kopecky J, Jezek P, Drahotka Z, Houstek J. (1987) *Eur. J. Biochem.*, 164, 687-94.
- Kopecky J, Rossmeisl M, Hodny Z, Syrový I, Horáková M, Kolarová P. (1996) *Am. J. Physiol.*, 270, E776-86.
- Krook, A., Digby, J., O'Rahilly, S., Zierath, J.R., Wallberg-Henriksson, H. (1998) *Diabetes*, 47, 1528-1531
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- Lanni A, Beneduce L, Lombardi A, Moreno M, Boss O, Muzzin P, Giacobino JP, Goglia F. (1999) *FEBS Lett.*;444, 250-4
- Larsen, P. und Clarke, C.F. (2002) *Science*, 295, 120-3
- Larrouy, D. et al. (1997) *Biochim. Biophys. Res. Com.*, 235, 760-764
- Las Varenne, J.B. Lloubes, R. und Lazdunski, C. (1984) *J. Mol. Biol.*, 180, 549-576
- Levy, D., Bluzat, A., Seigneuret, M., Rigaud, J.L. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1025, 179-90

- Lichtenberg, D. Robson, R.J., Dennis, E.A. (1983) *Biochim Biophys Acta*, 737, 285-304, Review.
- Lin, C.S., Klingenberg, M. (1980) *FEBS Lett.* 113, 299-303
- Liu, Q., Bai, C., Chen, F., Wang, R., MacDonald, T., Gu, M., Zhang, Q., Morsy, M.A. und Caskey, C.T. (1998) *Gene*, 207, 1-7
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mahlke, K. (1991) Dissertation, Universität München, 23-25
- Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., Nedergaard, J. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 28150-28160
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H., Pan, G. (1999) *FEBS Lett.*, 443, 326-330
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. und Collins, F.S. (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19, 1154.
- Marston, F.A.O. (1986) *Biochem. J.*, 240, 1-12.
- Mayinger, P. und Klingenberg, M. (1992) *Biochem.*, 31, 10536-43
- Miroux, B., Casteilla, L., Klaus, S., Raimbault, S., Gandin, S., Clement, J.M., Ricquier, D., Bouillaud, F. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 13603-13609
- Miroux B, Frossard V, Raimbault S, Ricquier D, Bouillaud F. (1993) *EMBO J.*, 12, 3739-45.
- Modriansky, M., Murdza-Ilgis, D.L., Patel, H.V., Freeman, K.B. und Garlid, K.D. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 24759-24762.
- Muller, V., Basset, G., Nelson, D.R. und Klingenberg, M. (1996) *Biochemistry*, 35, 16132-16143.
- Muller V, Heidkamper D, Nelson DR, Klingenberg M. (1997) *Biochem.*, 36, 16008-18.
- Murdza-Inglis, D. L., Patel, H. V., Freeman, K.B., Jezek, P., Orosz, D.E. und Garlid, K.D. (1991) *J. Biol. Chem.* 260, 11871-11875
- Murdza-Inglis, D.L., Modriansky, M., Patel, H.V., Woldegiorgis, G., Freeman, K.B. und Garlid, K.D. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 7435-8.
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Shabalina, I., Ohba, K., Ohlson, K., Jacobsson, A., Cannon, B. (2001) *Biochem. Soc. Trans.*, Review, 29, 756-63
- Nelson, D.R. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1275, 133-137.
- Nicholls, D.G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 49, 585-593
- Nicholls, D.G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 549, 1-29

- Oberg, K., Chrnyk, B.A., Wetzel, R. und Fink, A.L. (1994) *Biochemistry*, 33, 1628-1634.
- Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D, Perusse L, Bouchard, C. (1994) *Int. J. Obes. Relat. Metab.*, 18, 526-31.
- Palmieri, F., (1994) *FEBS Lett.*, 346, 48-54
- Palmieri L, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE. (1996) *FEBS Lett.*, 399, 299-302.
- Papa, L.J. und Weber, B.E. (1997) *J.Gen. Intern. Med.*, 37, 1002-4
- Paternostre MT, Roux M, Rigaud JL. (1988) *Biochemistry*, 27, 2668-77
- Phelps A, Wohlrab H. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 19882-5.
- Phelps, A., Briggs, C., Mincone, L. und Wohlrab, H. (1996) *Biochemistry*, 35, 10757-10762.
- Phelps A., Briggs C., Haefele, A., Mincone, L., Ligeti, E., Wohlrab, H. (2001) *Biochem.*, 40, 2080-6.
- Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 8705-12
- Rafael, J. und Heldt, H.W. (19??) *FEBS Lett.*, 63, 304-308 1976.
- Raimbault S, Dridi S, Denjean F, Lachuer J, Couplan E, Bouillaud F, Bordas A, Duchamp C, Taouis M, Ricquier D. (2001) *Biochem. J.*, 353, 441-4
- Rial, E., Poustie, A., Nicholls, D.G. (1983) *Eur. J. Biochem.*, 137, 197-203
- Rial, E., Gonzalez-Barroso, Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jimenez-Jimenez, J., Ricquier, D., Gubern, M.und Bouillaud, F. (1999) *EMBO J.*, 18, 5827-5833
- Ricquier, D. und Bouillaud, F. (1997) *Prog. Nucl. Acid Res.*, 56, 83-108
- Ricquier D, Bouillaud F. (2000) *Biochem J.*, 345, 161-79. Review.
- Rigaud, J.-L., Pitard, B. und Levy, D. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1231, 223-246.
- Riordan, J.F., McElvany, K.D., Borders, C.L. (1977) *Science*, 195, 884-886
- Rudolph, R. und Lilie, H. (1996) *FASEB J.*, Review, 10, 49-56
- Runswick, M.J., Powell, S.J., Nyren, P., Walker, J.E. (1987) *EMBO J.*, 6, 1367-1373
- Runswick, M.J., Walker, J.E., Bisaccia, F., Iacobazzi, V., Palmieri, F. (1990) *Biochem.*, 29, 11033-11040
- Sambroock, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sanchis, D. et al. (1998), JBC, 273, 34611-34615
- Sanger, F., Niklen, S., und Coulson, A.R. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.
- Schaffner, W. und Weissmann, C. (1973) Anal. Biochem., 30, 502-514.
- Schertler, G.F.X. (1992) Curr. Opin. Struct. Biol., 52, 534-544
- Schoemaker, J.M., Brasnett, A.H., Marston, F.A.O. (1985) EMBO J., 4, 775-80
- Sharp, P.M., Tuohy, T.M.F. und Mosurski, K.R. (1986) Nuc. Acids Res., 14, 5125-5143.
- Sheppard DN, Welsh MJ. (1993) Ann. N Y Acad. Sci. 707, 275-84. Review.
- Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Hahn AF, O'Connell P, Wasmuth JJ. (1993) Genet., 5, 351-8
- Simonyan, R.A., Jimenez, M., Ceddia, R.B., Giacobino, J.-P., Muzzin, P., Skulachev, V.P. (2001) Biochim. Biophys. Acta, 45044, 1-9
- Skulachev, V.P. (1991) FEBS Lett. 294, 158-162
- Skulachev, V.P. (1998) Biochim. Biophys. Acta, 1363, 100-124
- Slavik, J. (1982) FEBS Lett., 140, 22-26
- Sluse, F.E., Jarmuszkiewicz (2002) FEBS Lett., 510, 117-120
- Smith, R.E., Roberts, J.C., Hittelman K.J. (1966) Science, 154, 653-654
- Steams, T., Ma, H. und Botstein, D. (1990) Meth. Enzymol., 185, 60-89.
- Strange, K. (1998) J. Gen. Physiol., 111, 617-22
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M., Brand, M.D. (1999) Biochim. Biophys. Acta, 1413, 50-4
- Stuart, J.A., Harper, J.A. Brindle, K.M., Jekabsons, M.B. und Brand, M.D. (2001) Biochem. J., 356, 779-789
- Stuart, J.A., Harper, J.A. Brindle, K.M., Jekabsons, M.B. und Brand, M.D. (2001) J. Biol. Chem., 276, 18633-18639
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990) Methods in Enzymology, 185, 60-89.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986) J. Mol. Biol., 189, 113-130
- Tsuboyama-Kasaoka, N., Tsunoda, N., Maruyama, K., Takahashi, M., Kim, H., Ikemoto, S., Ezaki, O. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., 247, 498-503

- Vercesi, A.E., Martins, I.S. Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cucovia, I.M. und Charmowich, H. (1995), *Nature*, 375-24
- Verkman, A.S., Takla R., Sefton, B. Basbaum, C. Widdicombe (1989) *Biochemistry*, 28, 4240-4244.
- Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J.S., Lowell, B.B. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 235, 79-82
- Vidal-Puig, A. et al. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 16258-16266
- Vik, S.B., Long, J.C., Wada, T., Zhang, D. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, 1458, 457-466
- Voehringer, D.N., Meyn, R.E. (2000) *Antioxid Redox Signal., Review*, 2, 537-50
- Wada, A., Mathew, P.A., Barnes, H.J., Sanders, D., Estabrook, R.W. und Waterman, M.R. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, 290, 376-280
- Weigle, D.S. und Levin, B.E. (2000) *Obes. Res.*, 8, 385-391???
- Wells, M.A. und Hanahan, D.J. (1969) *Biochemistry*, 8, 414-424.
- Winkler, E. und Klingenberg, M. (1992) *Eur. J. Biochem.*, 207, 135-145.
- Winkler, E. und Klingenberg, M. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 2508-2515.
- Winkler, E., Wachter, E. und Klingenberg, M. (1997) *Biochemistry*, 36, 148-155.
- Winkler, E. Heidkämper, D., Klingenberg, M., Liu, Q. und Caskey, T. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 282, 334-340
- Zettlmeissl, G. Rudolph, R., Jaenicke, R. (1979) *Biochem.*, 18, 5567-5571

Lebenslauf

Name: Karina Frischmuth
Geburtstag: 22.09.1966
Geburtsort: Peine

Schulausbildung:

1973 – 1977 Eichendorffgrundschule in Peine
1977 – 1986 Gymnasium am Silberkamp in Peine
Juni 1986 Abitur

Berufsausbildung und -tätigkeit:

08/ 1986 – 06/ 1988 Lehre beim Landkreis Peine mit dem Berufsabschluss:
Verwaltungsfachangestellte
07/ 1988 – 09/ 1988 Tätigkeit als Verwaltungsfachangestellte beim Landkreis Peine im
Bereich Personalwesen

Hochschulstudium:

10/ 1988 – 01/ 1994 Studium an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu
Braunschweig im Studiengang Diplom-Chemie
05/ 1994 – 02/ 1996 Diplomarbeit in der Abteilung Genomanalyse der Gesellschaft für
biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig
Thema der Diplomarbeit: Entwicklung eines neuen Festphasen-
Priming-Konzeptes für die DNA-Sequenzanalyse
21.02.1996 Diplom

Wissenschaftliche Fortbildung:

05/ 1996 – 02/ 1997 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried
seit 04/ 1997 Promotion am Institut für Physikalische Biochemie der Ludwig-
Maximilians-Universität München, unter Anleitung von Prof. Dr. rer.
nat. Martin Klingenberg
Dissertation zur „*Struktur- und Funktionsanalyse der humanen
Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 (hUCP1, hUCP2 und hUCP3)*“